

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07K 16/28, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, C07K 16/46, G01N 33/53, 33/577, A61K 39/395	A1	(11) 国際公開番号 WO99/60025 (43) 国際公開日 1999年11月25日(25.11.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02661 (22) 国際出願日 1999年5月20日(20.05.99) (30) 優先権データ 特願平10/139000 1998年5月20日(20.05.98) JP (71) 出願人 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 設楽研也(SHITARA, Kenya) 〒251-0025 神奈川県藤沢市鵠沼石上2-1-19 Kanagawa, (JP) 伊東幹人(ITO, Mikito) 〒194-0023 東京都町田市旭町3-6-6 Tokyo, (JP) 川田陽子(KAWADA, Yoko) 〒270-1165 千葉県我孫子市並木9-10-5 Chiba, (JP) 中村和靖(NAKAMURA, Kazuyasu) 〒194-0032 東京都町田市本町田1411-10 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示。	

(54)Title: GENE RECOMBINANT ANTIBODIES

(54)発明の名称 遺伝子組換え抗体

(57) Abstract

A gene recombinant antibody specifically reacting with human VEGF receptor Flt-1; a gene recombinant antihuman VEGF receptor Flt-1 antibody having a neutralizing activity on human Flt-1; and a diagnostic method, diagnostics and remedies for diseases worsening in association with abnormal neovascularization such as proliferation or metastasis of solid tumor, arthritis in rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, premature retinopathy and psoriasis.

## (57)要約

本発明は、ヒトVEGF受容体Flt-1に特異的に反応する遺伝子組換え抗体を提供する。また、本発明は、ヒトFlt-1に対する中和活性を有する遺伝子組み換え抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を提供する。さらに、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾性など血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断方法、診断薬および治療薬を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジラント
BF ブルキナ・ファン	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BH ベナン	GN ギニア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴー	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジエール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーロピア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

### 遺伝子組換え抗体

#### 技術分野

本発明は、 固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、 慢性関節リウマチにおける関節炎、 糖尿病性網膜症、 未熟児網膜症および乾鮮など血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用であるヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体、 該抗体を生産する細胞株および該抗体を用いてヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に検出する方法、 並びに該抗体を用いた 固形腫瘍、 慢性関節リウマチ、 糖尿病性網膜症、 未熟児網膜症および乾鮮などの診断方法、 診断薬および治療薬に関する。

#### 背景技術

血管新生は、 脊椎動物の個体の発生および組織の構築に重要な役割を果たすとともに、 成熟個体(雌)の性周期における黄体形成、 子宮内膜の一過性の増殖および胎盤形成などにも密接に関与している。 さらに、 病的状態としては、 固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、 糖尿病性網膜症および慢性関節リウマチの病態形成あるいは促進に血管新生が深く関与している [J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。 血管新生は、 血管新生因子の分泌が引き金となり、 分泌された血管新生因子の近傍にある既存の血管の内皮細胞からのプロテアーゼ分泌による基底膜、 間質の破壊、 続いて起こる血管内皮細胞の遊走、 増殖により、 管腔が形成され、 血管が新生される過程よりなる [J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。 血管新生を誘導する因子としては、 vascular permeability factor(以下、 VPF と略記する)、 vascular endothelial growth factor(以下、 VEGF と略記する)があり(以下、 VPF/VEGF と記す)、 これらは発生過程における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている [Advances in Cancer Research, 67, 281 (1995)]。 VPF/VEGF はホモダイマーよりなる分子量約 4 万の蛋白質であり、 1983 年に血管透過性促進因子(Vascular permeability factor: VPF) として [Science, 219, 983 (1983)]、 1989 年に血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF) として [Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)] 報告されたが、 cDNA クローニングの結果、 両者は同一

の物質であることが明らかとなった[Science, 246, 1306 (1989); Science, 246, 1309 (1989)](以下、VPF/ VEGF は VEGF と記す)。VEGF の活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対する、増殖促進活性[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、遊走促進活性[J. Immunology, 152, 4149 (1994)]、メタロプロテアーゼ分泌促進活性[J. Cell. Physiol., 153, 557 (1992)]、ウロキナーゼ、tPA 分泌促進活性[Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 902 (1991)]などが知られており、in vivo において血管新生促進活性[Circulation, 92, suppl II, 365 (1995)]、血管透過性促進活性[Science, 219, 983 (1983)]などがこれまでに知られている。VEGF は血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であり[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、またmRNAのオルタナティブ・スプライシング(Alternative splicing)により分子量の異なる4種類の蛋白質が存在することが報告されている[J. Biol. Chem., 67, 26031 (1991)]。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成に VEGF が深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに腎癌[Cancer Research, 54, 4233 (1994)]、乳癌[Human Pathology, 26, 86 (1995)]、脳腫瘍[J. Clinical Investigation, 91, 153 (1993)]、消化器癌[Cancer Research, 53, 4727 (1993)]、卵巣癌[Cancer Research, 54, 276 (1994)]などの多くのヒト腫瘍組織における VEGF の産生が報告されている。また、乳癌患者の腫瘍における VEGF 発現量と患者の生存率との相関性を検討した結果、VEGF 高発現腫瘍は、VEGF 低発現腫瘍に比べて腫瘍血管新生が盛んであり、かつ VEGF 高発現腫瘍の乳癌患者は、VEGF 低発現腫瘍の乳癌患者に比べて生存率が低いことも明らかとなっている[Japanese J. Cancer Research, 85, 1045 (1994)]。また、ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗 VEGF モノクローナル抗体は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている[Nature, 362, 841 (1993)]。さらに、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗 VEGF モノクローナル抗体は癌転移を抑制できることが報告されている[Cancer Research, 56, 921 (1996)]。また、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度の VEGF が検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示されている

[*Biochimica et Biophysica Acta*, 1221, 211 (1994)]。

糖尿病網膜症においては、血管新生の異常により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内の VEGF レベルが正相関することが報告されている [*New England J. Medicine*, 331, 1480 (1994)]。また、サルの網膜症モデルにおいて抗 VEGF 中和モノクローナル抗体の眼内投与により VEGF 活性を抑制すると血管新生が抑制されることが報告されている [*Arch Ophthalmol.*, 114, 66 (1996)]。

慢性関節リュウマチの関節炎の病態の進展(骨、軟骨の破壊)には血管新生を伴うが、慢性関節リュウマチ患者の関節液中には VEGF が高濃度で含まれていること、関節中のマクロファージが VEGF を産生することが報告されている [*Journal of Immunology*, 152, 4149 (1994); *J. Experimental Medicine*, 180, 341 (1994)]。

VEGF 受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する fms-like tyrosine kinase(以下、Flt-1 と略記する) [*Oncogene*, 5, 519 (1990); *Science*, 255, 989 (1992)] および kinase insert domain-containing receptor(以下、KDR と略記する) [WO92/14748; *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 88, 9026 (1991); *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187, 1579 (1992); WO94/11499] が報告されている。Flt-1 および KDR は、7 個のイムノグロブリン様部位よりなる細胞外領域とチロシンキナーゼ部位よりなる細胞内領域とを有する、分子量 180~200 キロダルトンの膜蛋白質である。VEGF と、Flt-1 および KDR とは、Kd 値が 20 pM および 75 pM で特異的に結合し、また Flt-1 および KDR は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7533 (1993); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8915 (1993)]。Flt-1 の様々な疾患における発現については、ヒトグリオblastoma組織の腫瘍血管内皮細胞 [*Nature*, 359, 845 (1992)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞 [*Cancer Research*, 53, 4727 (1993)] で、正常組織の血管内皮細胞に比べ flt-1 mRNA の発現が上昇していることが報告されている。さらに、慢性関節リュウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (in situ hybridization) により flt-1 mRNA の発現が認められることが報告されている [*J. Experimental Medicine*, 180, 341 (1994)]。これらの結果は、腫瘍血管新生において

VEGF-VEGF レセプターFlt-1 系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。Flt-1 は VEGF が結合すること、細胞内ドメインが自己リン酸化されることが報告されているが[Science, 255, 989 (1992)]、詳しい機能については不明である。しかし、flt-1 遺伝子を破壊した flt-1 ノックアウトマウスは発生初期の血島形成や、それに続く血管新生において、血管内皮細胞の形態異常により血管構築が異常となり胎生 8.5 ～9.5 日齢で死亡することから、Flt-1 は血管新生における血管内皮細胞の管腔形成に必須の機能を果たしていると推定されている[Nature, 376, 66 (1995)]。

以上のことから、VEGF 受容体 Flt-1 に結合し、Flt-1 に対する中和活性を有する抗体は固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾鮮など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断、治療に有用であることが期待される。

一般にヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることによりヒト体内にヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体ができる。その結果、投与されたヒト以外の動物抗体と反応し、副作用を引き起こしたり[J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984); Blood, 65, 1349 (1985); J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1242 (1985)]、抗体がはやくクリアランスされたり[J. Nucl. Med., 26, 1011 (1985); Blood, 65, 1349 (1985); J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988)]、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている[J. Immunol., 135, 1530 (1985); Cancer Res., 46, 6489 (1986)]。

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型 CDR(complementary determining region; 以下、CDR と略記する場合もある) 移植抗体(再形成ヒト抗体)のようなヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体は、抗体可変領域(以下、V領域と称す)がヒト以外の動物抗体由来で抗体定常領域(以下、C領域と称す)がヒト抗体由来である抗体であり[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851 (1984)]、ヒトに投与した場合、ヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体はほとんど惹起されず、血中半減期が 6 倍のびることが報告されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220 (1989)]。ヒト型 CDR 移植抗体はヒト抗体の CDR をヒト以外の動物由来の抗

体の CDR と置換した抗体であり[Nature, 321, 522 (1986)]、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が 4~5 倍伸びることが報告されている[J. Immunol., 147, 1352 (1991)]。

従って、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対して特異的に結合するキメラ抗体、ヒト化抗体は、ヒト体内に投与したときにヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体が生じないことによる、副作用の減少、および血中半減期の延長により、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾鮮など異常な血管新生により病態が進行する疾患等に対する高い治療効果が期待される。

さらに、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、一本鎖抗体[Science, 242, 423 (1988)]あるいはジスルフィド安定化抗体[Molecular Immunology, 32, 249 (1995)]といった、より小さな抗体分子の作製が行われている。一本鎖抗体やジスルフィド安定化抗体はモノクローナル抗体あるいはヒト化抗体に比べ、その分子量が小さいことから組織移行性、血中からのクリアランスに優れ、イメージング等への応用、さらにはトキシンとの複合体の作製も行われ、治療効果も期待されている[Cancer Research, 55, 318(1995)]。従って、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 特異的に結合する一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾鮮など異常な血管新生により病態が進行する疾患等に対する高い診断、治療効果が期待される。

### 発明の開示

固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症あるいは乾鮮など異常な血管新生により病態が進行する疾患を診断、治療するための有用な方法が求められている。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体は、血管新生部位を検出および抑制することができ、上記のような異常な血管新生により病態が進行するする疾患の診断および治療に役立つと期待される。

本発明は、以下の(1)~(68)に関する。

(1)ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する遺伝子組換え抗体。

本発明の遺伝子組換え抗体は、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え

技術を用いて改変したものである。遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ならびに一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体などの抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。

(2)ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端アミノ酸から 750 番目に存在するエピトープを認識する上記(1)記載の遺伝子組換え抗体。

(3)ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端アミノ酸から 338 番目に存在するエピトープを認識する上記(1)記載の遺伝子組換え抗体。

(4)ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端アミノ酸から数えて 100～204 番目に存在するエピトープを認識する上記(1)記載の遺伝子組換え抗体。

(5)ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 Flt-1 への結合を阻害し、かつヒト Flt-1 に対する中和活性を有する上記(1)記載の遺伝子組換え抗体。

(6)遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体、抗体断片から選ばれる上記(1)記載の抗体。

本発明におけるヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体を包含する。

本発明の抗体断片は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体断片である Fragment of antigen binding (Fab と略記する)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFv と略記する) およびジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFv と略記する)を包含する。以下、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体または抗体断片を抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体と略記する。

(7)ヒト化抗体が、ヒト抗体 IgG 型に属する上記(6)記載の抗体。

(8)ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である、上記(6)記載の抗体。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域(以下、重鎖は H 鎖として、可変領域は V 領域として HV または VH とも称す)および軽鎖可変領域(以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL とも称す)ヒト抗体の重鎖定常領域(以下、定常領域は C 領域として CH とも称す)およびヒト抗体の軽鎖定常領域(以下、CL とも称す)とからなる抗体を意味する。

本発明のヒト型キメラ抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

本発明のヒト型キメラ抗体の構造としては、いずれのイムノグロブリン(以下、Ig と略記する)クラスに属するものでもよいが、IgG 型、さらには IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域が好ましい。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト抗体の VH および VL の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR 配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列で任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列をそれぞれ置換した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体 C 領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG 型、さらに IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域が好ましい。

(9)ヒト化抗体の抗体 VH の CDR が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列または配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を含む上記(8)記載のヒト化抗体。

(10)ヒト化抗体の VL の CDR が、配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列または配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を含む上記(8)記載のヒト化抗体。

(11)ヒト型キメラ抗体が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の VH および VL と、ヒト抗体の CH および CL とからなる、上記(8)記載のヒト型キメラ抗体。

(12)VH および VL のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1732(FERM BP-5698)またはモノクローナル抗体 KM1750(FERM BP-5700)から選ばれるモノクローナル抗体

の VH および VL のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(11)記載のヒト型キメラ抗体。

(13)VH のアミノ酸配列が配列番号 86 または 88 に記載されたアミノ酸配列である、上記(11)記載のヒト型キメラ抗体。

(14)VL のアミノ酸配列が配列番号 87 または 89 に記載されたアミノ酸配列である、上記(11)記載のヒト型キメラ抗体。

(15)VH のアミノ酸配列が配列番号 86 記載のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 87 のアミノ酸配列を含む上記(11)記載のヒト型キメラ抗体。

(16)VH のアミノ酸配列が配列番号 88 記載のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 89 のアミノ酸配列を含む上記(11)記載のヒト型キメラ抗体。

(17)ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するヒト型キメラ抗体が、KM2532 および KM2550 から選ばれる上記(11)記載のヒト型キメラ抗体。

(18)上記(11)～(17)のいずれか1つに記載のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するヒト型キメラ抗体をコードする DNA。

(19)上記(18)記載の DNA とタンデムカセットベクター pKANTEX93 とを含有する組換えベクター。

(20)上記(19)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(21)上記(20)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(11)～(17)記載のヒト型キメラ抗体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

(22)ヒト型 CDR 移植抗体がヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域 CDR と、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の C 領域および V 領域フレームワーク領域とからなる抗体である上記(8)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(23)ヒト型 CDR 移植抗体の VH の CDR が、配列番号 5、6 および 7 または配列番号 11、12 および 13 である、上記(22)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(24)ヒト型 CDR 移植抗体の VL の CDR が、配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列または配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列である、上記(22)記載のヒ

ト型 CDR 移植抗体。

(25)ヒト型 CDR 移植抗体が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列を VH の CDR として含み、かつ配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列を VL の CDR として含む、上記(22)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(26)ヒト型 CDR 移植抗体が、配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を VH の CDR として含み、かつ配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を VL の CDR として含む、上記(22)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(27)VH のアミノ酸配列が配列番号 90 記載のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 92 記載のアミノ酸配列を含む、上記(22)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(28)VH のアミノ酸配列が配列番号 91 または配列番号 95 のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 93、配列番号 94 または配列番号 96 のアミノ酸配列を含む、上記(22)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(29)ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554 および KM8555 から選ばれる上記(22)記載のヒト型 CDR 移植抗体。

(30)上記(22)～(29)のいずれか1つに記載のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体をコードする DNA。

(31)上記(30)記載の DNA とタンデムカセットベクターpKANTEX93 とを含有する組換えベクター。

(32)上記(31)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(33)上記(32)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(22)～(29)記載のヒト型 CDR 移植抗体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

(34)抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化 Fv からなる群より選ばれるいずれか1つである、上記(6)記載の抗体。

Fab は、IgGのヒンジ領域で2本の H 鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素ペパインで分解して得られた、H 鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明の Fab は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体をパパイン処理して得ることができる。または、該抗体の Fab 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

Fab' は、上記  $F(ab')_2$  のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明の Fab' は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab' 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

$F(ab')_2$  は、IgG のヒンジ領域の 2 個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2 つの Fab 領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約 10 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明の  $F(ab')_2$  は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗体の  $F(ab')_2$  断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、 $F(ab')_2$  を製造することができる。

一本鎖抗体(以下、scFv とも称す)は、一本の VH と一本の VL とを適當なペプチドリシンカーカー(以下、P と称す)を用いて連結した、VH—P—VL ないしは VL—P—VH ポリペプチドを示す。本発明で使用される scFv に含まれる VH および VL は、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明の一本鎖抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築した後、該 cDNA を該発現ベクターに挿入し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ該発現ベクターを導入することにより発現させ製造することができる。

ジスルフィド安定化抗体(以下、dsFv とも称す)は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法

[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれる VH あるいは VL はモノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のジスルフィド安定化抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、該 cDNA を適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

(35)一本鎖抗体が、抗体の VH および VL を含む、上記(34)記載の一本鎖抗体。

(36)一本鎖抗体の VH および VL のアミノ酸配列が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の VH および VL のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(35)記載の一本鎖抗体。

(37)一本鎖抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(35)記載の一本鎖抗体。

(38)一本鎖抗体の VH および VL のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 86 および 87 であるモノクローナル抗体の VH および VL のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(36)記載の一本鎖抗体。

(39)一本鎖抗体の VH および VL のアミノ酸配列が、配列番号 88 および 89 であるモノクローナル抗体の VH および VL のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(36)記載の一本鎖抗体。

(40)一本鎖抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列を VH の CDR として含み、かつ配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列を VL の CDR として含む、上記(37)記載の一本鎖抗体。

(41)一本鎖抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列が、配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を VH の CDR として含み、かつ配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を VL の CDR として含む、上記(37)記載の一本鎖抗体。

(42)一本鎖抗体の VH のアミノ酸配列が配列番号 90 記載のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 92 記載のアミノ酸配列を含む、上記(37)記載の一本鎖抗

体。

(43)一本鎖抗体の VH のアミノ酸配列が配列番号 91 または配列番号 95 のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 93、配列番号 94 または配列番号 96 のアミノ酸配列を含む、上記(37)記載の一本鎖抗体。

(44)ジスルフィド安定化抗体が、抗体の VH および VL を含む、上記(34)記載のジスルフィド安定化抗体。

(45)ジスルフィド安定化抗体の VH および VL のアミノ酸配列が、それぞれヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の VH および VL のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(44)記載のジスルフィド安定化抗体。

(46)ジスルフィド安定化抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列が、それぞれヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(44)記載のジスルフィド安定化抗体。

(47)ジスルフィド安定化抗体の VH および VL のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 86 および 87 である、上記(45)記載のジスルフィド安定化抗体。

(48)ジスルフィド安定化抗体の VH および VL のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 88 および 89 である、上記(45)記載のジスルフィド安定化抗体。

(49)ジスルフィド安定化抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列を VH の CDR として含み、かつ配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列を VL の CDR として含む、上記(46)記載のジスルフィド安定化抗体。

(50)ジスルフィド安定化抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列が、配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を VH の CDR として含み、かつ配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を VL の CDR として含む、上記(46)記載のジスルフィド安定化抗体。

(51)ジスルフィド安定化抗体の VH のアミノ酸配列が配列番号 90 記載のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 92 記載のアミノ酸配列を含む、上記(46)記載のジスルフィド安定化抗体。

(52) ジスルフィド安定化抗体の VH のアミノ酸配列が配列番号 91 または配列番号 95 のアミノ酸配列を含み、VL のアミノ酸配列が配列番号 93、配列番号 94 または配列番号 96 のアミノ酸配列を含む、上記(46)記載のジスルフィド安定化抗体。

(53) 上記(1)に記載されたヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する遺伝子組換え抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR から選ばれるアミノ酸配列を含むペプチド。

(54) H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR が、配列番号 5、6、7、8、9 および 10 記載のアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 1 アミノ酸配列を含む、上記(53)記載のペプチド。

(55) H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR が、配列番号 11、12、13、14、15 および 16 記載のアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 1 アミノ酸配列を含む、上記(53)記載のペプチド。

(56) 上記(1)～(55)のいずれかに記載された抗体またはペプチドが、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドである抗体またはペプチド。

融合抗体または融合ペプチドは、上述の抗体またはペプチドに放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体またはペプチドをいう。

本発明の融合抗体または融合ペプチドは、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体またはペプチドを放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子の薬剤などと化学的に結合させることにより製造することができる。

また、蛋白質との融合抗体または融合ペプチドについては、抗体またはペプチドをコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞に発現させることにより製造することができる。

低分子の薬剤は、ナイトロジエン・マスター、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、マイトマイシン C、ダウノルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチンのような植物アルカロイド、タ

モキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤[臨床腫瘍学(日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社)]、またはハイドロコーチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤[炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社]などがあげられる。

(57) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に検出する方法。

(58) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に定量する方法。

(59) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に検出する方法。

(60) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に定量する方法。

(61) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

(62) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に定量する方法。

(63) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合を阻害する方法。

(64) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 機能を中和する方法。

(65) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを用いて、血管内皮細胞の遊走を阻害する方法。

(66) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体

またはペプチドを用いる、血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断方法。

(67) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを有効成分として含有する、血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断薬。

血管新生の異常により病態が進行する疾患とは、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬などという。固形腫瘍としては、乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、肺癌などがあげられる。

(68) 上記(1)～(17)、(22)～(29)、(34)～(56)のいずれか1つに記載された抗体またはペプチドを有効成分として含有する、血管新生の異常により病態が進行する疾患の治療薬。

以下に、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する、またはヒト Flt-1 に対する中和活性を有する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体断片の製造法、ならびに該抗体によるヒト VEGF 受容体 Flt-1 の検出および定量法について説明する。

### 1. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の製造法

#### (1) 抗原の調製

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などをあげることができる。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-Flt-1 細胞 [Oncogene, 10, 135 (1995)] 等をあげることができる。

また、遺伝子工学的手法を用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 をコードする DNA を取得し、アミノ酸の長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質として発現させて抗原とするともできる。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 をコードする全長あるいはその部分断片 cDNA [Oncogene, 5, 519 (1990); 第18回日本分子生物学会年会議・講演要旨集、演題番号 2P-

227(1995年12月)]を適当なプロモータ下流に挿入した組み換えベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたヒトVEGF受容体Flt-1発現細胞を、適当な培地内で培養することにより細胞内または培養上清中にヒトVEGF受容体Flt-1の全長または部分断片をそのまま、または融合蛋白質として生産することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21(ファーミンジエン社製)、High Five(インビトロジエン社製)等が例示される。

本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX(ファルマシア社製)、pETシステム(ノバジェン社製)などが例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE<sub>p</sub>13(ATCC37115)、YE<sub>p</sub>24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法[Methods. Enzymol., 194, 182(1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929(1978)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163(1983)]等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107[特

開平 3-22979 ; Cytotechnology, 33, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem. 101, 1307 (1987) ] 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウィルス(CMV)の IE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVの IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ(サブルメント1~34)、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリ・マニュアル(Baculovirus expression vectors, A laboratory manual)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、p VL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジエン社製)等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盜蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等が用いられる。

また、ファーミンジエン社製バキュロゴールドスターーキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five 等の昆虫細胞

に該組み換えウィルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる [Bio/Technology, 6, 47(1988)]。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボ・プレス (Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press) New York(1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略記する)に記載されている方法に準じて行うことができる。

融合させる蛋白質としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテイン A、プロテイン A の IgG 結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテイン G、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合蛋白質ドメイン、Tac 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる [実験医学, 13, 469-474(1995)]。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい (モレキュラー・クローニング 第2版)。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下、15~40°Cで16~96時間行う。培養期間中、pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生素質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用さ

れているRPMI1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35~37°Cで3~7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地[ファーミンジエン(Pharmingen)社製]、SF900IIISFM[ライフテクノロジーズ(Life Technologies)社製]、ExCell400、ExCell405 [いずれも JRH バイオサイエンシーズ(JRH Biosciences)社製]等が用いられる。培養は、25~30°Cで1~4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞および昆虫細胞の培地中に血清が含有されているが、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として精製することを容易にするため、好ましくは血清無添加の培地を用いる。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん渦後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよいが、本発明においてはマウスおよびラットを用いる例を説明する。

3～20週令のマウスまたはラットに、上記1(1)で得られた蛋白質を抗原として免疫し、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロイドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。各投与後3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原として用いた可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1あるいはヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現しているNIH3T3細胞に対しての反応性について、酵素免疫測定法などで確認し[酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊(1976年)]、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原物質の最終投与後3～7日目に、免疫したマウスより公知の方法[アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー(Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、以下、アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す]に準じて脾臓を摘出し、脾細胞と骨髄腫細胞とを融合させる。

### (3)骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Euro. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2)[Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)[J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)]など、イン・ビトロ(in vitro)で増殖可能な骨髄腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法(アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)に従い、細胞融合時までに $2 \times 10^7$ 個以上の細胞数を確保する。

### (4)細胞融合

上記で得られた抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸

濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH7.2)などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地{正常培地[RPMI-1640 培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール( $5 \times 10^{-5}$ M)、ジェンタマイシン(10  $\mu$  g/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL 社製、10%)を加えた培地]にヒポキサンチン( $10^{-4}$ M)、チミジン( $1.5 \times 10^{-5}$ M)およびアミノブテリン( $4 \times 10^{-7}$ M)を加えた培地}を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(5) マウスあるいはラット抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体の選択

マウスまたはラット抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアルに述べられている方法などに従い、以下に述べる測定法により行う。これらの方法により、後述する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト化抗体、該抗体断片を産生する形質転換株の培養上清中に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体あるいはすべての精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体の結合活性を測定することができる。

酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などを96ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応する

モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

当該ハイブリドーマ株の具体例としては、ハイブリドーマ株 KM1732 (FERM BP-5698)、KM1748 (FERM BP-5699) および KM1750 (FERM BP-5700) があげられる。

また、上述の第一抗体と、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したヒト VEGF とを混合して反応させた後、標識物質に応じた反応を行うことにより、ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 Flt-1 への結合阻害活性を測定することができる。該方法を用いることにより、ヒト VEGF 阻害活性の高いハイブリドーマのスクリーニングを行うことができる。

#### (6) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2,6,10,14-テトラメチルペントデカン (Pristane) 0.5ml] を腹腔内投与し、2 週間飼育する] した 8 ~ 10 週令のマウスまたはヌードマウスに、1(4)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはセルロファイン GSL2000 (生化学工業社製) のカラムなどを用いて、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられる。

マウス IgG1、IgG2a およびヒト IgG1 タイプは、補体依存性細胞傷害活性 (以下、CDC 活性) および抗体依存性細胞傷害活性 (以下、ADCC 活性) を有し、治療への応用上、有用である。

### 2. 組換え抗体の作製方法 (I) — 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体の作製方法

#### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベク

ターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の C 領域である CH および CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。

ヒト抗体の C 領域としては、例えば、ヒト抗体 H 鎖では C  $\gamma$  1 や C  $\gamma$  4、ヒト抗体 L 鎖では C  $\kappa$  等の任意のヒト抗体の C 領域を用いることができる。ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体 C 領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274[Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4[Cytotechnology, 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー[Biochem. Biophys. Res. Comun., 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリン H 鎖のプロモーター[Cell, 41, 479 (1985)]とエンハンサー[Cell, 33, 717 (1983)]等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖、L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい[J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。

## (2)ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得する。

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を產生する細胞、例えば、マウスヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体產生ハイブリドーマ等より mRNA を抽出し、cDNA を合成す

る。合成した cDNA を、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の C 領域部分あるいは V 領域部分をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、および VL をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

### (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングするための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA を下記に述べる合成 DNA を介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成 DNA は、ヒト以外の動物の抗体の V 領域の 3'末端側の塩基配列とヒト抗体の C 領域の 5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するように DNA 合成機を用いて製造する。

### (4) ヒト以外の動物の抗体の CDR 配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成する VH 及び VL は、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域(以下、FR 領域と称す)とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個の相補性決定領域(CDR)から成っている[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services,(1991); 以下、シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレストと記す。]。そして各 CDR アミノ酸配列(CDR 配列)は、既知の抗体の V 領域のアミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することにより同定することができる。

### (5)ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR を移植するためのヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列を VH、VL それぞれについて選択する。ヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来の V 領域の FR のアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。

例えば、Protein Data Bank に登録されているヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の V 領域の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）があげられるが、充分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列と高い相同意、好ましくは 65%以上の相同意を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列をコードする DNA 配列と目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を連結させて、VH、VL それぞれのアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。CDR 移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計した DNA 配列を得るためにには、全 DNA 配列をカバーするように各鎖について数本の合成 DNA を設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクション（Polymerase Chain Reaction；以下、PCR と記す）を行う。PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから各鎖について、好ましくは、6本の合成 DNA を設計する。反応後、增幅断片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を含むプラスミドを取得する。また、約 100 塩基よりなる合成 DNA を用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を構築することもできる。

### (6)ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR のみをヒト抗体の V 領域の FR 間に、単純に移植しただけでは、その活性はもとのヒト以外の動物の

抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。そこでヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X線結晶解析あるいはコンピューター・モデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記2(5)に記載のPCRを行うことにより達成できる。PCR後の増幅断片を適當なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター(以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す)を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20~35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20~35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適當なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

#### (7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

前記2(1)のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子の上流に、前記2(5)および2(6)で取得したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築するためのPCRの際に5'末端および3'末端の合成DNAの末端に適當な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体のC領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

### (8)ヒト化抗体の一過性(トランジェント)発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターをCOS-7細胞(ATCC CRL1651)に導入してヒト化抗体の一過性発現[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, pp283 (1991)]を行い、その活性を測定することができる。

COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, pp283 (1991)]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記1(5)に記載の酵素免疫測定法(ELISA法)等により測定することができる。

### (9)ヒト化抗体の安定(ステーブル)発現および活性評価

前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下、DHFR遺伝子と称す)が欠損したCHO細胞[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)]、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と称す)等があげられる。

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418およびFCSを含むRPMI1640培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記1(5)に記載の方法などに

より測定する。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる(アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル 第8章)。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法(アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル 第12章)等で測定する。

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体の VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性の測定は前記1(5)に記載の方法などにより測定することができる。

### 3. 組換え抗体の作製方法(II)

#### (1) 抗体断片 Fab、Fab' および $F(ab')_2$ の作製方法

上述した抗体を酵素で処理することにより、抗体断片を生成させる。酵素としては、ペプシン、トリプシンなどをあげることができる。

または、該抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体の Fab、Fab' あるいは  $F(ab')_2$  断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab、Fab' あるいは  $F(ab')_2$  を製造することができる。

生成される抗体断片は、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティーコロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した Fab、Fab' および  $F(ab')_2$  の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法(アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル 第12章)等で測定する。

精製した Fab、Fab' および  $F(ab')_2$  の反応性、また、Fab、Fab' および  $F(ab')_2$  の VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性の測定は前記1(5)に記載の方法などにより測定することができる。

#### (2) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 一本鎖抗体の作製方法

前記2(2)、2(5)および2(6)に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移

植抗体の VH および VL をコードする cDNA を一本鎖抗体発現用ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を組込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

選択された発現用ベクターに、VH-P-VL あるいは VL-P-VH (P はペプチドリンカー) からなる一本鎖抗体をコードする cDNA を適切なプロモーター、および必要に応じてシグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードする cDNA が挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードする cDNA は、VH をコードする cDNA と VL をコードする cDNA とを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードする合成 DNA を用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加が VH および VL の抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えば Pantoliano らにより示されたもの [Biochemistry, 30, 10117 (1991)] あるいはそれを改変したものを用いることができる。

### (3) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ジスルフィド安定化抗体の作製方法

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA のそれぞれの適切な位置の 1 アミノ酸残基に相当する塩基配列をシステイン残基に相当する塩基配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製す

ことができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記2(5)の PCR を用いた変異導入法により行うことができる。

得られた改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体 H 鎮発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 L 鎮発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を組込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4[Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体 L 鎮発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 H 鎮発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。

また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

#### (4) 各種抗体の発現および活性評価

前記3(1)～(3)で構築された抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体発現ベクター、ジスルフィド安定化抗体 H 鎮発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎮発現ベクターをエレクトロポレーション法[特開平 2-257891; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的の抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H 鎮あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎮を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H 鎮あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎮の発現は前記1(5)に記載の方法等により確認することができる。

一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H 鎮あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎮の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、

抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒(インクルージョン・ボディー)として存在している抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過クロマトグラフィーを実行することにより達成することができる。

精製された一本鎖抗体は、前記1(5)に記載の方法等により測定することができる。

精製されたジスルフィド安定化抗体 H鎖とジスルフィド安定化抗体 L鎖は、各々を混合したのち、活性を有する構造へと導く操作[refolding 操作, Molecular Immunology, 32, 249 (1995)]によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティーコロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記1(5)に記載の方法等により測定することができる。

#### 4. 融合抗体および融合ペプチドの作製方法

本発明で使用される抗体またはペプチドに、放射性同位元素、毒素、サイトカインまたは酵素等の蛋白質、低分子の薬剤などを、化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドも抗体の誘導体として使用することができる。

抗体またはペプチドと毒素蛋白質とを化学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドは、文献[Anticancer Research, 11, 2003 (1991); Nature Medicine, 3, 350 (1996)]記載の方法等に従って作製することができる。

抗体またはペプチドと、毒素、サイトカインまたは酵素等の蛋白質とを遺伝子工学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドは、文献[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 974 (1996); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7826 (1996)]記載の方法等に従って作製することができる。

抗体またはペプチドと低分子抗癌剤を化学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドは、文献[*Science*, 261, 212 (1993)]記載の方法等に従って作製することができる。

抗体またはペプチドと放射性同位元素を化学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドは、文献[*Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 3, 60 (1990); *Anticancer Research*, 11, 2003 (1991)]記載の方法等に従って作製することができる。

これらの誘導体は、抗体分子の特異性に従って放射性同位元素、毒素、サイトカインまたは酵素等の蛋白質、低分子の薬剤などを標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断あるいは治療を可能にすることが期待されている。

##### 5. 抗体の使用方法(I)

上述した抗VEGF受容体Flt-1抗体、ペプチド、それらと他分子との融合抗体、または融合ペプチドは、ヒトVEGF受容体Flt-1と結合し、ADCC、CDC等の抗体のエフェクタ活性を介してVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現している細胞を破壊するため、乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、肺癌などの固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬などの血管新生の異常により病態が進行する疾患の治療等に有用である。

本発明の抗体、ペプチド、融合抗体または融合ペプチドを含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸收を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体またはペプチドおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10 \mu g/kg$ ～ $8mg/kg$ である。

本発明のヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体またはペプチドは、乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、肺癌など固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬などの血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断薬あるいは治療薬に用いることができる。

さらに、本発明の抗体またはペプチドはヒトFlt-1に対して中和活性を有するため、ヒトVEGFのFlt-1への結合を阻害する。すなわち、Flt-1自己リン酸化を阻害し、VEGF依

存的ヒト血管内皮細胞の遊走を阻害する。したがって、乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、肺癌などの固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬などの血管新生の異常により病態が進行する疾患の治療薬として用いることができる。

また、本発明で使用される抗体またはペプチドの各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、補体依存性細胞障害活性(CDC活性)測定法、抗体依存性細胞障害活性(ADCC活性)測定法等があげられ、インビトロ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993), Cancer Research, 54, 1511 (1994)]記載の方法等に従って行うことができる。

## 6. 抗体の使用方法(II)

また、本発明は、ヒトVEGF受容体Flt-1またはヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法、可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1を免疫学的に検出および定量する方法、ヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1との結合を阻害する方法およびヒトVEGF受容体Flt-1機能を中和する方法、血管内皮細胞の遊走を阻害する方法に関する。

本発明の抗体またはペプチドを用いて、ヒトVEGF受容体Flt-1、ヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現した細胞または可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法(ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法[単クローン抗体実験マニュアル(講談社サイエンティフィック、1987年)、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法(東京化学同人、1986年)]などがあげられる。

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体またはペプチドを反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート(FITC)などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメ

ーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法(ELISA)とは、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体またはペプチドを反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法(RIA)とは、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体またはペプチドを反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート(FITC)などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

また、ヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1との結合の阻害活性は、増殖因子と受容体の結合測定法[新生化学実験講座7 増殖分化因子とその受容体(東京化学同人、1991年)]等の方法に準じて、本発明の抗体を用いたVEGF-VEGF受容体Flt-1結合阻害試験を行うことにより確認することができる。

すなわち、Flt-1を発現している細胞あるいは組織に放射性物質等を標識したVEGFを反応させ、Flt-1発現細胞あるいは組織に結合したVEGFをシンチレーションカウンターなどで測定する方法である。放射性物質等を標識したVEGFと同時に本発明の抗体またはペプチドを反応させることで、放射性物質等を標識したVEGFがFlt-1に結合するのを阻害する活性を測定することが可能である。

VEGF受容体Flt-1の自己リン酸化阻害活性は、増殖因子受容体の自己リン酸化測定法[続生化学実験講座 情報伝達と細胞応答(東京化学同人、1986年)]等の方法に準じて、抗体またはペプチドを用いた、VEGF-VEGF受容体Flt-1の自己リン酸化阻害試験を行うことにより確認することができる。

すなわち、Flt-1を発現している細胞あるいは組織にVEGFを反応させ、VEGFが結

合することで亢進する Flt-1 の自己リン酸化を免疫沈降法およびウェスタンプロット法などで検出する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体またはペプチドを反応させることで、VEGF が結合することにより亢進される Flt-1 の自己リン酸化を阻害する活性を測定することが可能である。

ヒト VEGF の阻害活性は、VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖、遊走、およびチューブ形成試験[新生化学実験講座10 血管(内皮と平滑筋)(東京化学同人、1991年)]を行うことにより確認することができる。

VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞の増殖促進活性を細胞数を測定する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体またはペプチドを反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞の増殖促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

VEGF 依存的な血管内皮細胞の遊走試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞の遊走促進活性を顕微鏡を用いて観察する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体またはペプチドを反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞の遊走促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

VEGF 依存的な血管内皮細胞のチューブ形成試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞のチューブ形成促進活性を顕微鏡を用いて観察する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体またはペプチドを反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞のチューブ形成促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

以下、それらの一例について説明する。

#### (1) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を用いた免疫細胞染色

まず、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞を調製する。浮遊細胞についてはそのまま、付着細胞についてはトリプシン EDTA にて細胞をはがした後、免疫細胞染色用緩衝液(1%BSA、0.02%EDTA、0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS)などに懸濁し、 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  個ずつに分注する。1(4)で得られた抗ヒト VEGF 受容体

Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは2(9)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体産生形質転換株の培養上清、または1(6)、2(9)あるいは3(4)で得られた精製抗体、または公知の方法(酵素抗体法:学際企画刊 1985 年)でビオチン標識した該抗体を 0.1~50  $\mu$  g/ml の濃度になるように免疫細胞染色用緩衝液あるいは 10% 動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて希釈したものを 20~500  $\mu$  l ずつ分注し、氷冷下で 30 分間反応させる。1(4)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは2(9)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体産生形質転換株の培養上清、または1(6)、2(9)あるいは3(4)で得られた精製抗体を反応させた場合、免疫細胞染色用緩衝液で細胞を洗浄後、FITC あるいはフィコエリスリンなどの蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体、抗ラットイムノグロブリン抗体あるいは抗ヒトイムノグロブリン抗体を 0.1~50  $\mu$  g/ml 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を 50~500  $\mu$  l ずつ分注し、氷冷下で 30 分間遮光して反応させる。また、ビオチン標識した該抗体を反応させた場合、FITC あるいはフィコエリスリンなどの蛍光色素で標識した streptavidin を 50~500  $\mu$  l ずつ分注し、氷冷下で 30 分間遮光して反応させる。反応後は、よく免疫細胞染色用緩衝液で洗浄し、セルソーターにより解析する。

## (2) ウエスタンプロット法によるヒト VEGF 受容体 Flt-1 の検出

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を発現している細胞、例えばヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現 NIH3T3 細胞 (NIH3T3-Flt-1 と称す)、およびコントロール細胞、例えば NIH3T3 細胞 (NIH3T3-Neo と称す) [Oncogene, 10, 135 (1995)] 等より、細胞膜成分を調製し、還元条件下でレーンあたりの蛋白質量として 0.1~30  $\mu$  g の膜成分を SDS-PAGE 法により泳動する。泳動された蛋白質を PVDF 膜にトランスファーし 1 % BSA を含む PBS に室温で 30 分間反応させブロッキング操作を行う。1(4)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは2(9)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体産生形質転換株の培養上清、または1(6)、2(9)あるいは3(4)で得られた精製抗体を反応させ、0.05% Tween を含む PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG、抗ラット IgG または抗ヒト IgG を室温で 2 時間反応させる。0.05% Tween を含む PBS で洗浄し、ECL Western blotting

detection reagents (Amersham 社製) 等を用いて、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が結合したバンドを検出する。

(3) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体による可溶性 VEGF 受容体 Flt-1 定量

1(6)、2(9)あるいは3(4)で得られた精製抗体を一次抗体として適当なプレートにコートし、1(1)で得られたヒト VEGF 受容体 Flt-1 またはヒト VEGF 受容体 Flt-1 と他の蛋白質との融合蛋白質などの組換え蛋白質 0.056～10,000ng/ml、もしくはヒト血清などの検体を反応させる。プレートをよく洗浄した後、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した1(6)、2(9)あるいは3(4)で得られた精製抗体のうち一次抗体として使用した抗体とは異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体またはヒト化抗体を反応させた後、標識物質に応じた反応を行なう。精製可溶性 VEGF 受容体 Flt-1 に対する反応性をもとに検量線を描き、検体中の可溶性 VEGF 受容体 Flt-1 濃度を算出する。

ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合を阻害する方法については、以下の方法があげられる。

(4) 抗体を用いた VEGF-VEGF 受容体 Flt-1 結合阻害試験

96 ウェル・マルチスクリーン・IP プレート (96-well MultiScreen-IP Plate; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化する。水で洗浄後、PBS で 0.1～10  $\mu$  g/ml の濃度に希釈したヒト VEGF 受容体 Flt-1 またはヒト VEGF 受容体 Flt-1 と他の蛋白質との融合蛋白質などの組換え蛋白質を、50  $\mu$  l/ ウェルで分注し、4 °C で一晩放置して吸着させる。洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を 100  $\mu$  l/ ウェル加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックする。PBS で洗浄後、前記1(4)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは前記2(9)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体産生形質転換株の培養上清、または前記1(6)、2(9)あるいは3(4)で得られた精製抗体を 50  $\mu$  l/ ウェルで分注し、さらに、0.1～10ng/ml の <sup>125</sup>I 標識 VEGF (アマシャム社製) を 50  $\mu$  l/ ウェル加え、室温で 1.5 時間反応させる。0.05% tween-PBS で洗浄後、50°C でウェルを乾燥させ、シンチレーターを 20 から 100  $\mu$  l/ ウェル加え、各ウェルに結合した <sup>125</sup>I 標識 VEGF の放射活性をトップカウント (パ

ッカード社製)等を用いて測定する。

7. 乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、肺癌などの固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に基づく疾患、異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断方法

乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、肺癌などの固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に基づく疾患、異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト VEGF 受容体 Flt-1 を、本発明の抗体またはペプチドを用いて、上述した免疫学的に検出または定量する方法があげられる。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図 プラスミド pBS1732H の造成工程を示した図である。

第 2 図 プラスミド pBS1732L の造成工程を示した図である。

第 3 図 プラスミド pKANTEX1732H の造成工程を示した図である。

第 4 図 プラスミド pKANTEX1732 の造成工程を示した図である。

第 5 図 プラスミド pBS1750H の造成工程を示した図である。

第 6 図 プラスミド pBS1750L の造成工程を示した図である。

第 7 図 プラスミド pKANTEX1750H の造成工程を示した図である。

第 8 図 プラスミド pKANTEX1750 の造成工程を示した図である。

第 9 図 精製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 の SDS-PAGE (4~15% グラジェントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。レーン 1 が低分子マーカー、レーン 2 が還元条件下での KM2532、レーン 3 が還元条件下での KM2550、レーン 4 が高分子マーカー、レーン 5 が非還元条件下での KM2532、レーン 6 が非還元条件下での KM2550 の泳動パターンをそれぞれ示す。

第 10 図 精製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 の可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N との結合活性を示した図である。(A) はプレートに吸着させる可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N の濃度を一定 ( $1 \mu \text{g/ml}$ ) にし、添加するヒト型キメラ抗体濃度を変化させた場合の結果である。縦軸は可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N との結合活性、横軸はヒト型キメラ抗体濃度をそれぞれ示す。△が KM2532、○が KM2550 の活性をそれぞれ示す。(B) はプレートに吸着させる可

溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N の濃度を変化させ、一定濃度(10  $\mu$  g/ml)のヒト型キメラ抗体の結合活性を測定した結果である。縦軸は可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N との結合活性、横軸はプレートに吸着させた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N の濃度をそれぞれ示す。△が KM2532、○が KM2550 の活性をそれぞれ示す。

第 11 図 精製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を示した図である。○が KM1732、□が KM1750、●が KM2532、■が KM2550 の活性をそれぞれ示す。

第 12 図 プラスミド phKM1732HV0 の造成工程を示した図である。

第 13 図 プラスミド phKM1750HV0 の造成工程を示した図である。

第 14 図 プラスミド phKM1732LV0 の造成工程を示した図である。

第 15 図 プラスミド phKM1750LV0(IV)の造成工程を示した図である。

第 16 図 プラスミド pKANTEX1732HV0 の造成工程を示した図である。

第 17 図 プラスミド pKANTEX1732HV0LV0 の造成工程を示した図である。

第 18 図 プラスミド pKANTEX1750HV0LV0(IV)を示した図である。

第 19 図 プラスミド pVL1393/Flt 3N の造成工程を示した図である。

第 20 図 プラスミド pVL1393/Flt 7N の造成工程を示した図である。

第 21 図 精製した Flt-1 7N および Flt-1 3N の SDS ポリアクリルアミド電気泳動(5 ~20%グラジェントゲルを使用)のパターンを示した図である。左より、分子量マーカー、Flt-1 3N、Flt-1 7N の泳動パターンをそれぞれ示す。還元条件下で電気泳動を行った。

第 22 図 プレートコートした可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N への  $^{125}\text{I}$ -ヒト VEGF の結合に及ぼす可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の阻害効果を解析した結果を示す。

第 23 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の結合反応性を酵素免疫測定法にて検討した結果を示す。

第 24 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体による VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を検討した結果を示す。

第 25 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732、KM1748 および

KM1750 によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を検討した結果を示す。

第 26 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732、KM1748 および KM1750 によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞の結合阻害活性を検討した結果を示す。

第 27 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 のヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞 NIH3T3-Flt-1 およびコントロール細胞 NIH3T3-Neo 細胞との反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

第 28 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1737 のヒト VEGF 受容体 Flt-1 との反応性をウエスタンプロッティングにより検討した結果を示す。レーン 1 は、NIH3T3-Flt-1 細胞、レーン 2 は、NIH3T3-Neo 細胞のウエスタンプロッティングのパターンを示す。

第 29 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732 およびビオチン化 KM1730 を用いて可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N および FLT-1 7N の定量系を検討した結果を示す。

第 30 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732、KM1750、および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 の、可溶性ヒト VEGF 受容体およびその誘導体である Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2 および KDR 7N の結合反応性を酵素免疫測定法で検討した結果を示す。

第 31 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 の可溶性ヒト VEGF 受容体およびその誘導体である Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2 および KDR 7N の濃度依存性結合反応について酵素免疫測定法で検討した結果を示す。

第 32 図 可溶性ヒト VEGF 受容体の各種誘導体の模式図を示す。

第 33 図 プラスミド phKM1750LV0 (I)の造成工程を示した図である。

第 34 図 プラスミド pKANTEX1750HV0LV0 (I)の造成工程を示した図である。

第 35 図 プラスミド phKM1750HV3 の造成工程を示した図である。

第 36 図 プラスミド phKM1750LV4 の造成工程を示した図である。

第 37 図 プラスミド pKANTEX1750HV3LV0 (I)の造成工程を示した図である。

第 38 図 プラスミド pKANTEX1750HV3LV0 (IV)の造成工程を示した図である。

第 39 図 プラスミド pKANTEX1750HV0LV4 の造成工程を示した図である。

第 40 図 プラスミド pKANTEX1750HV3LV4 の造成工程を示した図である。

第 41 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 およびヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 の SDS-PAGE(4～15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。レーン 1～9 は非還元条件下での電気泳動パターン、レーン 10～19 までは還元条件下での電気泳動パターンを示す。レーン1および10は高分子分子量マーカー、レーン 19 は低分子分子量マーカー、レーン2および11はコントロール抗体である KM8969、レーン3および12は KM2550、レーン4および13は KM8550、レーン 5 および 14 は KM8551、レーン 6 および 15 は KM8552、レーン 7 および 16 は KM8553、レーン8および 17 は KM8554、レーン 9 および18は KM8555 を示す。

第 42 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 およびヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 の可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N との結合活性を示した図である。

第 43 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 およびヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 の可溶性ヒト VEGF 受容体各種誘導体 Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7N との結合活性を示した図である。

第 44 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 およびヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を示した図である。

第 45 図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体および CDR 移植抗体の H鎖可変領域のアミノ酸配列を示した図である。図中、KM1750mouse とは、KM1750 の H鎖可変領域アミノ酸配列、KM1750HV0 とは、KM1750 の H鎖可変領域内の CDR をヒトフレームワークに挿入して構成されるアミノ酸配列、KM1750HV3 とは、KM1750HV0 の

フレームワークのアミノ酸配列を一部 KM1750mouse のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を、それぞれ示す。

第46図 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体およびCDR移植抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列を示した図である。図中、KM1750mouseとは、KM1750のL鎖可変領域アミノ酸配列、KM1750LV0(I)とは、KM1750のL鎖可変領域内のCDRをヒトフレームワークに挿入して構成されるアミノ酸配列、KM1750LV4とは、KM1750LV0(I)のフレームワークのアミノ酸配列を一部 KM1750mouse のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を、それぞれ示す。

第47図 抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1732およびKM1750のVEGF依存性ヒト血管内皮細胞HUVECへの遊走阻害活性を検討したグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例1

1. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体をコードするcDNAの単離および解析

(1) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマからのmRNAの取得

インビトロジェン社製のmRNA抽出キットであるFast Trackを用い、キットに添付の使用説明書に従って、参考例1で得られた抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750生産ハイブリドーマ(それぞれFERM BP-5698、FERM BP-5700)の各 $1 \times 10^8$ 細胞より、それぞれmRNAを取得した。

(2) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマの重鎖および軽鎖cDNAライブラリーの作製

実施例1の1(1)で取得したKM1732およびKM1750のmRNAの各 $5 \mu g$ から、cDNA Synthesis Kit(ファルマシアバイオテク社製)を用い、キットに添付の使用説明書に従って、両端にEcoRI-NotIアダプターを有するcDNAをそれぞれ合成した。作製したそれぞれのcDNAの約 $6 \mu g$ を $10 \mu l$ の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG型抗体の重鎖(以下、H鎖と表記する)に対応する約1.5kbのcDNA断片と軽鎖(以下、L鎖と表記する)に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞ

れ約  $0.1 \mu \text{g}$  回収した。次に、それぞれの約 1.5kb の cDNA 断片  $0.1 \mu \text{g}$  および約 1.0kb の cDNA 断片  $0.1 \mu \text{g}$  と、Lambda ZAPII Vector (Lambda ZAPII Vector を EcoR Iで切斷後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase で処理したもの:ストラタジーン社製)の  $1 \mu \text{g}$  を T4 ligase 緩衝液(宝酒造社製)  $11.5 \mu \text{l}$  に溶解し、T4 DNA ligase (宝酒造社製) 175 単位を加えて、 $12^\circ\text{C}$ にて 24 時間インキュベートし、さらに室温にて 2 時間インキュベートした。それぞれの反応液のうち  $4 \mu \text{l}$ を常法(モレキュラー・クローニング 第2版)に従い、Gigapack Gold Packaging Kit (ストラタジーン社製)を使用してラムダファージにパッケージングし、これらを常法(モレキュラー・クローニング 第2版)に従って、Gigapack Gold Packaging Kit (ストラタジーン社製)に付属の大腸菌株 XL1-Blue [Biotechniques, 5, 376 (1987)]に感染させて、KM1732 および KM1750 の H鎖 cDNA ライブライマーおよび L鎖 cDNA ライブライマーとしてそれぞれ約  $4 \times 10^3$  個のファージクローンを取得した。

(3) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマの H鎖および L鎖をコードする cDNA のクローニング

実施例1の1(2)で作製したそれぞれのファージを常法(モレキュラー・クローニング 第2版)に従い、ニトロセルロースフィルター上に固定した。各ニトロセルロースフィルターを用いて ECL direct nucleic acid labeling and detection systems (アマシャム社製)に添付の使用説明書に従い、マウス免疫グロブリンの定常領域(以下、C領域と表記する)をコードする cDNA [H鎖はマウス C  $\gamma$  1cDNA の断片 [Cell, 18, 559 (1979)]、L鎖はマウス C  $\kappa$  cDNA の断片 [Cell, 22, 197 (1980)]をプローブとしてそれと強く結合したファージクローンを取得した。次に、Lambda ZAPII Vector (ストラタジーン社製)に添付の使用説明書に従い、ファージクローンをプラスミド pBluescriptSK(-)に変換し、最終的に KM1732 の H鎖をコードする cDNA を含む組換えプラスミド KM1732HA2 および KM1732 の L鎖をコードする cDNA を含む組換えプラスミド KM1732L2-1、KM1750 の H鎖をコードする cDNA 含む組換えプラスミド KM1750H2-1 および KM1750 の L鎖をコードする cDNA を含む組換えプラスミド KM1750L3-1 を取得した。組換えプラスミド KM1732HA2 を有する大腸菌 XL1-Blue MRF'/KM1732HA2、組換えプラスミド KM1732L2-1 を有する大腸菌 XL1-Blue

MRF'/KM1732L2-1、組換えプラスマド 1750H2-1 を有する大腸菌 XL1-Blue  
MRF'/KM1750H2-1 および組換えプラスマド KM1750L3-1 を有する大腸菌 XL1-Blue  
MRF'/KM1750L3-1 を有する大腸菌株は、それぞれ FERM BP-6354、FERM BP-  
6352、FERM BP-6353、FERM BP-6355 として、平成10年5月14日付けで工業技術  
院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されて  
いる。

(4) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体の H 鎖および L 鎖をコー  
ドする cDNA の可変領域の塩基配列の決定

実施例1の1(3)で得られた各抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体  
の H 鎖および L 鎖をコードする cDNA の可変領域(以下、V 領域と表記する)の塩基  
配列を、得られたプラスミドの 0.1  $\mu$  g を用いて BigDye Terminator Cycle  
Sequencing Ready Reaction Kit (アプライド バイオシステムズ社製)に添付の説明書  
に従って反応後、ABI PRISM™377(アプライド バイオシステムズ社製)により電気泳動  
し、決定した。決定したそれぞれの cDNA の塩基配列より、KM1732 および KM1750  
の H 鎖の V 領域(以下、VH と表記する)および L 鎖の V 領域(以下、VL と表記する)  
のアミノ酸配列を決定した。配列番号1に KM1732 の VH、配列番号2に KM1732 の  
VL、配列番号3に KM1750 の VH、配列番号4に KM1750 の VL のそれぞれの塩基配  
列を、配列番号 86 に KM1732 の VH、配列番号 87 に KM1732 の VL、配列番号 88  
に KM1750 の VH、配列番号 89 に KM1750 の VL のそれぞれのアミノ酸配列を示す。

(5) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体の H 鎖および L 鎖の CDR  
配列の同定

実施例1の1(4)で決定した各抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体  
の VH および VL のアミノ酸配列より、それぞれの VH および VL の CDR 配列を既知  
の抗体の V 領域のアミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジ  
カル・インタレスト)と比較することによって同定した。配列番号5、6および7に KM1732  
の VH の CDR1、CDR2 および CDR3、配列番号8、9および10に KM1732 の VL の  
CDR1、CDR2 および CDR3、配列番号11、12および13に KM1750 の VH の CDR1、  
CDR2 および CDR3、配列番号14、15および16に KM1750 の VL の CDR1、CDR2

および CDR3 のそれぞれのアミノ酸配列を示す。

## 2. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の製造

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する中和活性を有する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスマонクローナル抗体 KM1732 および KM1750 に由来する、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 を以下のようにして製造した。

### (1) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1732 の構築

WO97/10354 に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93 および実施例1の1項で得られたプラスマド KM1732HA2 および KM1732L2-1 を用いて抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1732 を以下のようにして構築した。

プラスミド pBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の  $3 \mu \text{g}$  を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、 $100 \mu \text{g}/\text{ml}$  BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 2.95kb の ApaI-NotI 断片を約  $2 \mu \text{g}$  回収した。次に、プラスミド KM1732HA2 の  $5 \mu \text{g}$  を 20mM トリス-酢酸 (pH7.9)、10mM 酢酸マグネシウム、50Mm 酢酸カリウム、1mM DTT および  $100 \mu \text{g}/\text{ml}$  牛血清アルブミン (以下、BSA と表記する) からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 NlaIV (ニューイングランドバイオラブズ社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、 $100 \mu \text{g}/\text{ml}$  BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.41kb の NlaIV-NotI 断片を約  $0.5 \mu \text{g}$  回収した。次に、配列番号17、18に記載の塩基配列を有する合成 DNA を合成し (サワディー・テクノロ

ジー社製)、各合成 DNA の  $0.3 \mu \text{g}$  ずつを  $15 \mu \text{l}$  の滅菌水に加え、 $65^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱した。該反応液を室温にて 30 分間放置した後、10 倍緩衝液[500mM トリス-塩酸(pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2  $\mu \text{l}$  と 10mM ATP 2  $\mu \text{l}$  を加え、更に 10 単位の T4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

上記で得られたプラスミド pBluescript SK(-)由来の ApaI-NotI 断片  $0.1 \mu \text{g}$  とプラスミド KM1732HA2 由来の NlaIV-NotI 断片  $0.1 \mu \text{g}$  とリン酸化合成 DNA  $0.05 \mu \text{g}$  を全量  $10 \mu \text{l}$  の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図 1 に示したプラスミド pBS1732H を得た。

次に、WO97/10354 に記載のプラスミド phKM1259LV0 の  $3 \mu \text{g}$  を 50mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu \text{g}/\text{ml}$  BSA からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素 SphI(宝酒造社製)を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 2.95kb の EcoRI-SphI 断片を約  $2 \mu \text{g}$  回収した。次に、プラスミド KM1732L2-1 の  $5 \mu \text{g}$  を 10mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、1mM DTT からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 MboII(東洋紡績社製)を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT からなる緩衝液  $10 \mu \text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI(宝酒造社製)を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.38kb の MboII-EcoRI 断片を約  $0.5 \mu \text{g}$  回収した。次に、配列番号 19、20 に記載の塩基配列を有する合成 DNA を合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成 DNA の  $0.3 \mu \text{g}$  ずつを  $15 \mu \text{l}$  の滅菌水に加え、 $65^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱した。該反応液を室温にて 30 分間放置した後、10 倍緩衝液[500mM トリス-塩酸(pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2  $\mu \text{l}$  と 10mM ATP 2  $\mu \text{l}$  を加え、更に 10 単位の T4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させ、5'末

端をリン酸化した。

上記で得られたプラスミド pHKM1259LV0 由来の EcoRI-SpII 断片 0.1  $\mu$  g 、プラスミド KM1732L2-1 由来の MboII-EcoRI 断片 0.1  $\mu$  g およびリン酸化合成 DNA 0.05  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、図2に示したプラスミド pBS1732L を得た。

次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の 3  $\mu$  g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT 、100  $\mu$  g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 12.75kb の ApaI-NotI 断片を約 1  $\mu$  g 回収した。次に、上記で得られたプラスミド pBS1732H の 5  $\mu$  g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT 、100  $\mu$  g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.46kb の ApaI-NotI 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。

上記で得られたヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 由来の ApaI-NotI 断片 0.1  $\mu$  g とプラスミド pBS1732H 由来の ApaI-NotI 断片 0.1  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、図3に示したプラスミド pKANTEX1732H を得た。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX1732H の 3  $\mu$  g を 50mM トリス-塩酸

(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 SphI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.20kb の EcoRI-SphI 断片を約 1  $\mu$  g 回収した。次に、上記で得られたプラスミド pBS1732L の 5  $\mu$  g を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 SphI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.39kb の EcoRI-SphI 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。

上記で得られたプラスミド pKANTEX1732H 由来の EcoRI-SphI 断片 0.1  $\mu$  g、プラスミド pBS1732L 由来の EcoRI-SphI 断片 0.1  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、図4に示したプラスミド pKANTEX1732 を得た。

## (2) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の発現ベクター pKANTEX1750 の構築

WO97/10354 に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクター pKANTEX93 および実施例1の1項で得られたプラスミド KM1750H2-1 および KM1750L3-1 を用いて抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の発現ベクター pKANTEX1750 を以下のようにして構築した。

プラスミド KM1750H2-1 の 5  $\mu$  g を 33mM トリス-酢酸 (pH7.9)、10mM 酢酸マグネシウム、66mM 酢酸カリウムおよび 100  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 Alw26I (ニューイングランドバイオラブズ社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100  $\mu$  g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて

分画し、約 0.41kb の Alw26I-NotI 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。次に、配列番号21、22に記載の塩基配列を有する合成 DNA を合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成 DNA の 0.3  $\mu$  g ずつを 15  $\mu$  l の滅菌水に加え、65°Cで 5 分間加熱した。該反応液を室温にて 30 分間放置した後、10 倍緩衝液[500mM トリス-塩酸(pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2  $\mu$  l と 10mM ATP 2  $\mu$  l を加え、更に 10 単位の T4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて 37°Cで 30 分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

実施例1の2(1)で得られたプラスミド pBluescript SK(-)由来の ApaI-NotI 断片 0.1  $\mu$  g とプラスミド KM1750H2-1 由来の Alw26I-NotI 断片 0.1  $\mu$  g とリン酸化合成 DNA 0.05  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図5に示したプラスミド pBS1750H を得た。

次に、プラスミド KM1750L3-1 の 5  $\mu$  g を 100mM トリス-塩酸(pH8.8)、440mM 塩化ナトリウム、12mM 塩化マグネシウム、14mM 2-メルカプトエタノールおよび 200  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 MaeII(ベーリンガー・マンハイム社製)を加えて 50°Cで 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI(宝酒造社製)を加えて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.38kb の MaeII-EcoRI 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。次に、配列番号23、24に記載の塩基配列を有する合成 DNA を合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成 DNA の 0.3  $\mu$  g ずつを 15  $\mu$  l の滅菌水に加え、65°Cで 5 分間加熱した。該反応液を室温にて 30 分間放置した後、10 倍緩衝液[500mM トリス-塩酸(pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2  $\mu$  l と 10mM ATP 2  $\mu$  l を加え、更に 10 単位の T4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて 37°Cで 30 分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

実施例1の2(1)で得られたプラスミド pHKM1259LV0 由来の EcoRI-SpI 断片 0.1  $\mu$

g、プラスミド KM1750L3-1 由来の *Mae*II-*Eco*RI 断片  $0.1 \mu g$  およびリン酸化合成 DNA  $0.05 \mu g$  を全量  $10 \mu l$  の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図6に示したプラスミド pBS1750Lを得た。

次に、上記で得られたプラスミド pBS1750H の  $5 \mu g$  を  $10mM$  トリス-塩酸(pH7.5)、 $10mM$  塩化マグネシウムおよび  $1mM$  DTT からなる緩衝液  $10 \mu l$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 *Apal*(宝酒造社製)を加えて  $37^{\circ}C$  で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、 $50mM$  トリス-塩酸(pH7.5)、 $100mM$  塩化ナトリウム、 $10mM$  塩化マグネシウム、 $1mM$  DTT、 $100 \mu g/ml$  BSA および  $0.01\%$  トライトン X-100 からなる緩衝液  $10 \mu l$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 *NotI*(宝酒造社製)を加えて  $37^{\circ}C$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約  $0.46kb$  の *Apal*-*NotI* 断片を約  $0.5 \mu g$  回収した。

実施例1の2(1)で得られたヒト化抗体発現用タンデムカセットベクター pKANTEX93 由来の *Apal*-*NotI* 断片  $0.1 \mu g$  とプラスミド pBS1750H 由来の *Apal*-*NotI* 断片  $0.1 \mu g$  を全量  $10 \mu l$  の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図7に示したプラスミド pKANTEX1750Hを得た。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX1750H の  $3 \mu g$  を  $50mM$  トリス-塩酸(pH7.5)、 $100mM$  塩化ナトリウム、 $10mM$  塩化マグネシウム、 $1mM$  DTT および  $100 \mu g/ml$  BSA からなる緩衝液  $10 \mu l$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 *Eco*RI(宝酒造社製)および制限酵素 *SplI*(宝酒造社製)を加えて  $37^{\circ}C$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約  $13.20kb$  の *Eco*RI-*SplI* 断片を約  $1 \mu g$  回収した。次に、上記で得られたプラスミド pBS1750L の  $5 \mu g$  を  $50mM$  トリス-塩酸(pH7.5)、 $100mM$  塩化ナトリウム、 $10mM$  塩化マグネシウム、 $1mM$  DTT および  $100 \mu g/ml$  BSA からなる緩衝液  $10 \mu l$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 *Eco*RI(宝酒造社製)および制限酵素 *SplI*(宝酒造社製)を加えて  $37^{\circ}C$  で 1 時間反応させた。該反応液

をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.39kb の EcoRI-SpII 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。

上記で得られたプラスミド pKANTEX1750H 由来の EcoRI-SpII 断片 0.1  $\mu$  g 、プラスミド pBS1750L 由来の EcoRI-SpII 断片 0.1  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図8に示したプラスミド pKANTEX1750 を得た。

(3) pKANTEX1732 および pKANTEX1750 を用いた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体のラットミエローマ YB2/0 細胞(ATCC CRL1581)での発現

YB2/0 細胞への抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1732 および pKANTEX1750 の導入は宮地らの方法に従い、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]にて行った。

実施例1の2項(1)、(2)で得られた pKANTEX1732 および pKANTEX1750 の 5  $\mu$  g を  $4 \times 10^6$  個の YB2/0 細胞へ導入後、40ml の RPMI1640-FCS(10) 培地[牛胎児血清(FCS) を 10% 含む RPMI1640 培地(日水製薬社製)]に懸濁し、96 ウェルマイクロタイプレート(スミロン社製)に 200  $\mu$  l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、ジェネティシン(以下、G418 と表記する、ギブコ社製)を 0.5mg/ml になるように添加してさらに 1~2 週間培養した。G418 耐性を有する形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の活性を以下に示す酵素免疫測定法により測定した。

#### 酵素免疫測定法

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N は、Tanaka らの方法[Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)]に従い調製した。96 ウェルの EIA 用プレート(グラナー社製)に、PBS で希釈した 1  $\mu$  g/ml の可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4°C で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1% BSA を含む PBS(以下、1%BSA-PBS と表記する)を 100  $\mu$  l/ウェル加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清を

50  $\mu$  l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween20を含むPBS(以下、0.05%tween-PBSと表記する)で洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(アメリカンコーレックス社製)を50  $\mu$  l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05%tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を50  $\mu$  l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE<sub>max</sub>(モレキュラー・デバイシーズ社製)を用いて測定した。

培養上清中に抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の活性が認められた形質転換株について、生産性を上げる目的で、0.5mg/ml G418および50nMメソトレキセート(以下、MTXと表記する、シグマ社製)を含むRPMI1640-FCS(10)培地に懸濁し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、1~2週間培養し、50nM MTX耐性を有する形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の活性を上記の酵素免疫測定法により測定した。活性の認められた形質転換株については、上記と同様の培養方法により、さらにMTX濃度を100nM、200nMと上げて行き、0.5mg/ml G418および200nM MTXを含むRPMI1640-FCS(10)培地で増殖可能でかつ、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株については2回の限界希釈法によるクローニングを経て、最終的な抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換細胞株とした。発現ベクターpKANTEX1732を導入して得られた形質転換細胞株、すなわち、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732由来の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM2532があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体をKM2532と命名した。また、発現ベクターpKANTEX1750を導入して得られた形質転換細胞株、すなわち抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750由来の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM2550があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体をKM2550と命名した。得られた各形質転換細胞クローンの抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の生産性は約5  $\mu$  g/10<sup>6</sup>細胞/24時間であった。

## (4) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の培養上清からの精製

実施例1の2(3)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体生産株

KM2532 および KM2550 を 0.5mg/ml G418 および 200nM MTX 含む GIT 培地(日本製薬社製)に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、175cm<sup>2</sup> フラスコ(グライナー社製)に 200ml ずつ計 5 本に分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、5~7 日間培養し、コンフルエントになった時点で各培養上清約 1.0L を回収した。カラムに約 1ml のプロセップ A (バイオプロセッシング社製)を充填し、10ml の 1M グリシン-0.15M NaCl(pH8.6)を用いて 1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 を含む培養上清をそれぞれ 1700ml、1800ml を 70ml/時の流速でプロセップ A カラムに通塔した。さらに 10ml の 1M グリシン-0.15M NaCl(pH8.6)を用いて 1ml/分の流速で洗浄した後、pH6、pH5 および pH4 の 50mM クエン酸緩衝液各 4ml で段階的に洗浄し、50mM クエン酸緩衝液(pH3.0)を 7ml 通塔してヒト型キメラ抗体を溶出した。その結果、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 がそれぞれ 0.4mg、0.3mg 得られた。

精製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は、SDS-PAGE 法で解析した。SDS-PAGE は公知の方法 [Anticancer Research, 12, 1121 (1992)] に従った。ゲルには 5~20% グラジエントゲル(アトー社製)を、分子量マーカーとしては低分子量タンパク質分子量マーカー「第一」II、高分子量タンパク質分子量マーカー「第一」III (第一化学薬品社製)を用い、還元および非還元条件下でレンジあたりのタンパク質量として 2.5 μg の抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 をそれぞれ泳動し、クーマシープリリアントブルーにて染色した。その結果を図9に示した。ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は、非還元条件下では分子量約 150 キロダルトンに IgG のバンドが認められ、還元条件下では約 50 キロダルトンに H 鎮のバンドが、約 25 キロダルトンに L 鎮のバンドが認められた。IgG 型の抗体は、還元条件下では分子間ジスルフィド結合が切断され、それぞれ 2 本の H 鎮および L 鎮に分解し、非還元条件下ではそれぞれ 2 本の H 鎮および L 鎮より構成される分子量 150 キロダルトンの分子として存在することと一致し、ヒト型キメラ

抗体 KM2532 および KM2550 は正しい構造の抗体分子であることが示された。

(5) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性

精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性を以下の手順に従い、確認した。

可溶性ヒト Flt-1 7N は Tanaka らの方法 [Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)] に従い調製した。

まず、酵素免疫測定法を用いて 96 ウェルの EIA 用プレートに吸着させる可溶性ヒト Flt-1 7N 量を固定し、添加するヒト型キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した。96 ウェルの EIA 用プレート(グライナー社製)に、PBS で希釈した  $1 \mu \text{g/ml}$  の可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を  $50 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で分注し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、 $1\% \text{BSA-PBS}$  を  $100 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。 $1\% \text{BSA-PBS}$  を捨て、 $0.152 \sim 333 \text{ng/ml}$  の精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 を  $50 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で分注し、室温で 1 時間反応させた。 $0.05\% \text{tween-PBS}$  で洗浄後、 $1\% \text{BSA-PBS}$  にて 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体(アメリカン コーレックス社製)を  $50 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で加えて室温で 1 時間反応させ、 $0.05\% \text{tween-PBS}$  で洗浄後、ABTS 基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を  $50 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で加えて発色させ、 $\text{OD}415\text{nm}$  の吸光度を  $E_{\text{max}}$  (モレキュラー・デバイシーズ社製)を用いて測定した。

その結果を図 10(A) に示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 は抗体濃度依存的にヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N に結合した。また、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 の結合活性はほぼ同等であった。

次に、酵素免疫測定法を用いて 96 ウェルの EIA 用プレートに吸着させる可溶性ヒト Flt-1 7N 量を変化させてヒト型キメラ抗体の結合活性を検討した。96 ウェルの EIA 用プレート(グライナー社製)に、PBS で希釈した  $0.04 \sim 10 \mu \text{g/ml}$  の可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を  $50 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で分注し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩放置して吸着させた。PBS で

洗浄後、1%BSA-PBS を  $100 \mu \text{l}$  /ウェル加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、 $10 \mu \text{g/ml}$  の精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 を  $50 \mu \text{l}$  /ウェルで分注し、室温で 1 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS にて 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体(アメリカン コーレックス社製)を  $50 \mu \text{l}$  /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を  $50 \mu \text{l}$  /ウェルで加えて発色させ、OD415nm の吸光度を  $E_{\text{max}}$ (モレキュラー・デバイシーズ社製)を用いて測定した。

その結果を図10(B)に示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 はプレートに吸着させた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N の濃度に依存した結合活性を示した。また、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 の結合活性はほぼ同等であった。

次に、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を以下のようにして検討した。96 ウェル・マルチスクリーン-IPプレート(ミリポア社製)にメタノールを  $100 \mu \text{l}$  /ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS で  $0.2 \mu \text{g/ml}$  の濃度に希釈した可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を  $50 \mu \text{l}$  /ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を  $50 \mu \text{l}$  /ウェル加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS 溶液で希釈し  $0.004 \sim 2 \mu \text{g/ml}$  の精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 および精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732、KM1750 を  $50 \mu \text{l}$  /ウェルで分注し、さらに、3ng/ml の  $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF(アマシャム社製)を  $50 \mu \text{l}$  /ウェルで加え室温で 1.5 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、50°Cにてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-〇(パッカード社製)を  $30 \mu \text{l}$  /ウェルで加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。その結果を図11に示す。図11に示したように抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は抗体濃度依存的にヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1

の結合を阻害した。また、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 および KM1750 と同等のヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を示し、ヒト型キメラ抗体はマウスモノクローナル抗体の活性を保持していることが示された。

#### (6) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体の認識するエピトープの解析

##### (6-1) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N、可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 の調製

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N、可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 を以下のようにして調製した。

##### (6-2) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する 19 アミノ酸及び成熟体の N 末端アミノ酸から 738 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N と称す)及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 7 個のイムノグロブリン様部位より構成される。

ヒト VEGF 受容体 KDR の完全長 cDNA をコードする cDNA クローン BCMGS-neo-KDR[Cell Growth & Differentiation 7, 213 (1996)]を EcoRI で切断し、KDR の細胞外領域及び膜結合領域をコードする約 2.8 kb の断片を pUC18 の EcoRI 部位に組み込むことによって、pUC-KDR を作製した。pUC-KDR を Xhol で切断し、Klenow 処理後、XbaI リンカー(配列番号 57)を挿入することによって pUC-KDR-Xb を作製した。pUC-KDR-Xb の XbaI-BamHI(2.3 kbp)断片を pBluescriptII KS(+)の XbaI/BamHI 部位に挿入した後、SphI-BamHI(5.2 kbp)断片を調製し、SnaBI 部位を含む合成リンカー(配列番号 58 及び配列番号 59)を挿入し、pBS-KDR-Xb-S を作製した。

pBS-KDR-Xb-S を SnaBI/BamHI で切断し、終止コドンと NotI 部位とを含む合成リンカー(配列番号 60 及び配列番号 61)を組み込み、pBS-KDR(Xb)-S-N を作製した。pBS-KDR-Xb-S-N の XbaI-NotI(2.3 kb)断片をバキュロウイルス

組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 XbaI 及び 3' 側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N 発現ベクター pVL-KDR-7N を作製した。

(6-3) 可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端から 750 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N のうち、N 末端から 2 番目のイムノグロブリン様部位に相当する、100 番目のアミノ酸から 204 番目のアミノ酸を、それぞれ 2 アミノ酸からなるリンカー (Gly-Ala, Gly-Thr) を介して、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の 2 番目のイムノグロブリン様部位に相当する、95 番目のアミノ酸から 199 番目のアミノ酸に置換したキメラタンパク質 Flt-1.K2 を発現させるためのベクターを以下の手順で作製した。

ヒト flt-1cDNA [Oncogene, 5, 519 (1990)] の EcoRI/HindIII (1.9 kb) 断片をベクター M13mp1 の EcoRI/HindIII に挿入し、pM13-flt を作製した。pM13-flt を大腸菌 XL1Blue に感染させ、宝酒造製の部位特異的変異導入用キット MutanK 添付のマニュアルに従って、培養上清より ssDNA を調製した。本 ssDNA を鋳型として、56 塩基から成るオリゴヌクレオチド (配列番号 62) 及び部位特異的変異導入用キット MutanK (宝酒造製) を用い、宝酒造製の部位特異的変異導入用キット MutanK 添付のマニュアルに従って部位特異的変異を行い、Flt-1 の細胞外領域の 2 番目のイムノグロブリン様部位をコードする領域を欠失させた変異 Flt-1 遺伝子を運ぶプラスミド (pM13-flt'-D2N) を作製した。次に、BCMGsneo-KDR [Cell Growth and Diff., 7, 213, (1996)] DNA 10ng を鋳型として用い、配列番号 63 及び配列番号 64 に示した塩基配列を有するプライマー各 10 pmol、TaqDNA ポリメラーゼバッファー、及び、10mM デオキシヌクレオチド三リン酸を含む溶液 100 ml に 2.5 units の TaqDNA ポリメラーゼを添加し、PCR 反応を行った。反応は、95°C で 90 秒間、50°C で 90 秒間、72°C で 90 秒間の反応を 30 回繰り返し、增幅した、KDR の細胞外領域の N 末端側から 2 番目のイムノグロブリン様部位をコードする DNA 断片を回収した。該 DNA 断片を

NarI/KpnI で切断し、340bp の NarI/KpnI 断片を得た。該 DNA 断片及び、pM13-flt'-D2N の SmaI/NarI(0.5 kb)断片を、pBluescriptII の SmaI/KpnI 部位に挿入し、pBS-flt-1'-KDR2N を作製した。pBS-flt-1'-KDR2N の BamH/KpnI(0.8kb)断片、pM13-flt'-D2N の KpnI/MunI(80 b)断片、及び、pVL-flt-1 の MunI/NotI(1.5 kb)断片を、pVL1393 の BamHII/NotI 部位に挿入し、Flt-1.K2 遺伝子を運ぶプラスミド PVL-fkf を作製した。

(6-4) 昆虫細胞による可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N および可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 発現を行うための組み換えウィルスの作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウィルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウィルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウィルスを取得する過程を経る。以上の過程をファーミンジエン社製バキュロゴールドスターーキット(製品番号 PM-21001K)を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

TMN-FH インセクトメディウム(ファーミンジエン社製)にて培養した昆虫細胞 Sf9(ファーミンジエン社製)に線状バキュロウィルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA(BaculoGold baculovirus DNA)、ファーミンジエン社製]および作製したトランスファーベクターDNAをリポフェクチン法にて導入すること[蛋白質核酸酵素、37, 2701 (1992)]により、組み換えバキュロウィルスを以下のようにして作製した。

(6-2) で作製した発現ベクターの 1  $\mu$  g と線状バキュロウィルス DNA の 20ng を 12  $\mu$  l の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン 6  $\mu$  l と蒸留水 6  $\mu$  l とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $1 \times 10^6$  個を 2ml の Sf900-II 培地[ギブコ(Gibco)社製]に懸濁し、直径 35mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウィルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え 27°C で 3 日間培養後、組み換えウィルスを含む培養上清 1ml を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地

1mlを加え、さらに27°Cで3日間培養し組み換えウィルスを含む培養上清をさらに1.5ml得た。さらに、(6-3)で作製した発現ベクターを用い同様の操作を行った。

次に蛋白質発現に用いるため、得られた組み換えウィルスを各々、以下の手順で増殖させた。

Sf9細胞 $2 \times 10^7$ 個を10mlのSf900-II培地に懸濁し、175cm<sup>2</sup>フラスコ(グライナー社製)に入れて室温で1時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに15mlのTMN-FHインセクトメディウムと上記の組み換えウィルスを含む培養上清のうち1mlを加え27°Cで3日間培養した。培養後上清を1,500×gで10分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力値をバキュロゴールドスターーキット・マニュアル(ファーミンジエン社製)に記載の方法で算定した。

Sf9細胞 $6 \times 10^6$ 個を4mlのSf900-II培地に懸濁し、直径60mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で1時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たにSf900-II培地400μlとSf900-II培地で1000倍に希釀した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で1時間放置した後、培地を除き5mlの1%低融点アガロース[アガープラーク・アガロース(Agarplaque Agarose)、ファーミンジエン社製]を含む培地(滅菌した1mlの5%アガープラークプラス・アガロース水溶液と4mlのTMN-FHインセクトメディウムを混和し、42°Cに保温したもの)を該シャーレに流し込んだ。室温で15分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレに巻き、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27°Cで6日間培養した。該シャーレに0.01%ニュートラルレッドを含むPBS1mlを加えさらに1日間培養した後、出現したプラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約 $1 \times 10^7$ プラークフォーミングユニット(以下、PFUと称す)/mlのウィルスを含んでいることがわかった。

(6-5)昆虫細胞における可溶性ヒトVEGF受容体KDR7N、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2の発現および精製

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N および可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を  $175\text{cm}^2$  フラスコ(グライナー社製)中の EX-CELL™ 400 培地 (JRH Bioscience 社製)30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。(6-3)および(6-4)で得られたトランスファーベクター由来の組み換えウイルスを約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU / ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™ 400 培地 30ml を加え 27°C にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N については、以下のようにして精製した。

50ml の DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech 社製)を充填したカラムが液の入口側に、40ml の Heparin Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech 社製)を充填したカラムが出口側になるように直列に接続し、300ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した。洗浄後、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む培養液 400~800ml を 50~100ml/時の流速で通塔した。更に、300ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した後、Heparin Sepharose CL-6B カラムのみに 400ml の 0~1M NaCl/20mM リン酸ナトリウム緩衝液にて連続濃度勾配をかけ、吸着蛋白質の溶出を行った。溶出液は 7ml ずつ分画し、各分画に含まれる蛋白質を SDS-PAGE にて解析し、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N を含む分画を 60~80ml 回収した。回収した精製画分はセントリプレップ 10 (アミコン社製)を用いて濃縮し、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 7N を溶液として 4.8ml (蛋白質濃度は  $815 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、純度は 70~80%) 得た。

可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 については、以下のように精製した。

カラムに約 20ml のヘパリンーセファロース CL-6B ゲル [ファルマシア・バイオテック (Pharmacia Biotech) AB 社製]を充填し、100ml の 20mM トリス-塩酸(pH7.5) 緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した可溶性ヒト VEGF 受容体キメラタンパク質 Flt-1 7N.K2 を含む培養液 900ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 100ml の 20mM

トリスー塩酸(pH7.5)を用いて0.5ml/分の流速で洗浄した後、濃度勾配が0M～1.5MのNaCl含有20mMトリスー塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を200ml通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に8mlずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析し、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2を含む分画を50～70ml回収し、セントリプレップ10(アミコン社製)を用いて濃縮した。濃縮後、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2を溶液としてそれぞれ5.8ml(蛋白濃度は588μg/ml、純度65～75%)を得た。

(6-6) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の認識するエピトープの解析

精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550の認識するエピトープを以下の手順に従い解析した。

可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7N(シグナル配列を含むN末端アミノ酸から750番目に相当)、可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 3N(シグナル配列を含むN末端アミノ酸から338番目に相当)、可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 2N(シグナル配列を含むN末端アミノ酸から223番目に相当)はTanakaらの方法[Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)]に従い調製した。可溶性ヒト受容体KDR 7N(シグナル配列を含まないN末端アミノ酸から738番目に相当)、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2(ヒトFlt-1 7Nのアミノ酸100～204番目をリンカーを介してヒトKDRのアミノ酸95～199番目に変換したもの)は(6-5)に従い調製した。実験に用いた可溶性ヒトVEGF受容体各種誘導体の模式図は図32に示した。

まず、酵素免疫測定法を用いて抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732、KM1750および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の反応性を比較した。96ウェルのEIA用プレート(グライナー社製)に、PBSで希釈した4μg/mlのFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nをそれぞれ50μl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100μl/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をロックした。1%BSA-PBSを捨て、0.1μg/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスマonoクローナル抗体KM1732またはKM1750、あるいは、精製抗ヒトVEGF受容体

Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 または KM2550 を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、室温で 1 時間反応させた。0.05%tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS にて 400 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体(ダコ社製)あるいは 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体(アメリカン コーレックス社製)を 50  $\mu$  l/ウェルで加えて室温で 1 時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を 50  $\mu$  l/ウェルで加えて発色させ、OD415nm の吸光度を  $E_{max}$  (モレキュラー・デバイシーズ社製)を用いて測定した。

その結果を第30図に示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732、KM1750 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 は Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N に結合し、Flt-1 7N.K2、KDR 7N には結合しなかった。従って、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732、KM1750 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532、KM2550 の認識するエピトープは、ヒト Flt-1 の N 末端アミノ酸から 100~204 番目までの領域に含まれることが示された。

次に、酵素免疫測定法を用いて 96 ウェルの EIA 用プレートに吸着させる Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7N 量を一定にし、添加するヒト型キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した。96 ウェルの EIA 用プレート(グライナー社製)に、PBS で希釈した 4  $\mu$  g/ml の Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7N をそれぞれ 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4 °C で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100  $\mu$  l/ウェル加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、0.0152~100 ng/ml の精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 または KM2550 を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、室温で 1 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体(アメリカン コーレックス社製)を 50  $\mu$  l/ウェルで加えて室温で 1 時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を 50  $\mu$  l/ウェルで加えて発色させ、OD415nm の吸光度を  $E_{max}$  (モレキュラー・デバイシーズ社

製)を用いて測定した。

その結果を第31図(上図)に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550は抗体濃度依存的にFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2Nに結合し、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nには結合しなかった。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の結合活性はほぼ同等であった。

次に、酵素免疫測定法を用いて96ウェルのEIA用プレートに吸着させるFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7N量を変化させてヒト型キメラ抗体の結合活性を検討した。96ウェルのEIA用プレート(グライナー社製)に、PBSで希釈した0.041~10 μg/mlの可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nをそれぞれ50 μl/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 μl/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、5 μg/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532またはKM2550をそれぞれ50 μl/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05%Tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(アメリカンコーレックス社製)を50 μl/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05%Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を50 μl/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE<sub>max</sub>(モレキュラー・デバイシズ社製)を用いて測定した。

その結果を第31図(下図)に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550はプレートに吸着させた可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2Nの濃度に依存した結合活性を示し、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nには反応しなかった。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の結合活性はほぼ同等であった。

### 3. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の製造

ヒトVEGF受容体Flt-1に対する中和活性を有する抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスマонクローナル抗体KM1732、KM1750および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550と同等の活性を有する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移

植抗体を以下のようにして製造した。

(1)既知のヒト抗体の VH の共通配列を基礎とする抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築

カバットらは[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991 、以下同様]、既知の様々なヒト抗体の VH をそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ I ~ III (HSG I ~ III) に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。そこで、それら共通配列を基礎として抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を設計することとした。まず、基礎とする共通配列を選択するために、各サブグループのヒト抗体の VH の共通配列のフレームワーク領域(以下、FR と表記する)のアミノ酸配列と抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 および KM1750 の VH の FR のアミノ酸配列との間の相同性を調べた(第1表)。

第 1 表

	HSGI	HSGII	HSGIII
KM1732	65.5	51.7	55.2
KM1750	67.8	49.4	54.0

その結果、KM1732、KM1750 ともにサブグループ I と最も相同性が高いことが確認され、サブグループ I の共通配列を基礎として抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を設計し、そのアミノ酸配列をコードする cDNA をポリメラーゼチェーンリアクション法(以下、PCR 法と表記する)を用いて以下のようにして構築した。

まず、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 の VH に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築について以下に説明する。配列番号 25 から 30 の塩基配列を有する 6 本の合成 DNA を合成した(サワディー・テクノロジー社製)。合成した各 DNA を最終濃度が 0.1  $\mu$  M と

なるように 200  $\mu$  M dNTP(宝酒造社製)、0.5  $\mu$  M M13primer RV(宝酒造社製)、0.5  $\mu$  M M13primer M4(宝酒造社製)および 2.5 単位の TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ(宝酒造社製)を含む 1 倍濃度の Ex Taq 緩衝液(宝酒造社製)50  $\mu$  l に加え、50  $\mu$  l の鉢油で覆い、DNA サーマルサイクラー PJ480(パーキン エルマー社製)にセットし、94°Cにて 2 分間、55°Cにて 2 分間、72°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。該反応液を QIA quick PCR Purification Kit(キアジェン社製)を用いて添付の説明書に従い処理し、20  $\mu$  l の滅菌水で精製、溶出した。次に、得られた溶出液を 10mM トリス-塩酸(pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$  l に加え、更に 20 単位の制限酵素 Apal(宝酒造社製)を加えて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100  $\mu$  g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI(宝酒造社製)を加えて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.44kb の Apal-NotI 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。

実施例1の2(1)で得られたプラスミド pBluescript SK(-)由来の Apal-NotI 断片 0.1  $\mu$  g と上記で得られた PCR 増幅断片の Apal-NotI 断片 0.1  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換した。10 個の形質転換大腸菌より各プラスミドを調製し、実施例1の1項(4)に記載の方法に従って、塩基配列を決定した結果、目的のアミノ酸配列をコードする cDNA を含む図12に示したプラスミド phKM1732HV0を得た。 phKM1732HV0 に含まれる抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH(以下、1732HV0 と表記する)の塩基配列を配列番号 31 およびアミノ酸配列を配列番号 90 に示した。

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1750 の VH に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築については、配列番号 32 から 37 の塩基配列を有する 6 本の合成 DNA(サワディー・テクノロジー社製)を用いて上記と同様の反応を行い、図13に示した目的のアミノ酸配列をコ

ードする cDNA を含むプラスマド phKM1750HV0 を得た。phKM1750HV0 に含まれる抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH(以下、1750HV0 と表記する)の塩基配列を配列番号 38 およびアミノ酸配列を配列番号 91 に示した。

(2) 既知のヒト抗体の VL の共通配列を基礎とする抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VL をコードする cDNA の構築

カバットらは既知の様々なヒト抗体の VL をそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ I ~ IV (HSG I ~ IV) に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。そこで、それら共通配列を基礎として抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を設計することとした。まず、基礎とする共通配列を選択するために、各サブグループのヒト抗体の VL の共通配列の FR のアミノ酸配列と抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 および KM1750 の VL の FR のアミノ酸配列との間の相同性を調べた(第2表)。

第 2 表

	HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
KM1732	66.2	57.5	62.5	63.8
KM1750	68.8	63.8	68.8	70.0

その結果、KM1732 はサブグループ I と最も高い相同性を示すこと、KM1750 はサブグループ I および IV とほぼ同等の高い相同性を示すことが確認され、それぞれサブグループ I およびサブグループ IV の共通配列を基礎として抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を設計し、そのアミノ酸配列をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下のようにして構築した。

まず、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 の VL に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VL をコードする cDNA の構築について以下に説明する。配列番号 39 から 44 の塩基配列を有する 6 本の合成 DNA を合成した(サワディー・テクノロジー社製)。合成した各 DNA を最終濃度が  $0.1 \mu M$  となるように  $200 \mu M$  dNTP(宝酒造社製)、 $0.5 \mu M$  M13 primer RV(宝酒造社製)、 $0.5$

$\mu$  M M13primer M4(宝酒造社製)および2.5単位のTaKaRa Ex Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を含む1倍濃度のEx Taq緩衝液(宝酒造社製)50  $\mu$  lに加え、50  $\mu$  lの鉛油で覆い、DNAサーマルサイクラーPJ480(パーキンエルマー社製)にセットし、94°Cにて2分間、55°Cにて2分間、72°Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。該反応液をQIA quick PCR Purification Kit(キアジェン社製)を用いて添付の説明書に従い処理し、20  $\mu$  lの滅菌水で精製し、溶出した。次に、得られた溶出液を50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100  $\mu$  g/ml BSAからなる緩衝液30  $\mu$  lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SphI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SphI断片を約0.5  $\mu$  g回収した。

実施例1の2(1)で得られたプラスミドphKM1259LV0由来のEcoRI-SphI断片0.1  $\mu$  gと上記で得られたPCR增幅断片のEcoRI-SphI断片0.1  $\mu$  gを全量10  $\mu$  lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5  $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換した。10個の形質転換大腸菌より各プラスミドを調製し、実施例1の1項(4)に記載の方法に従って、塩基配列を決定した結果、目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含む図14に示したプラスミドphKM1732LV0を得た。

phKM1732LV0に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVL(以下、1732LV0と表記する)の塩基配列を配列番号45およびアミノ酸配列を配列番号92に示した。

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750のVLに由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築については、ヒトサブグループIVの共通配列を基礎として利用する場合には配列番号46から51の塩基配列を有する6本の合成DNA(サワディー・テクノロジー社製)を用いて上記と同様の反応を行い、図15に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750LV0(IV)を得た。phKM1750LV0(IV)に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVL[以下、1750LV0(IV)と表記する]の塩基配列を配

列番号52、およびアミノ酸配列を配列番号93に示した。ヒトサブグループIの共通配列を基礎として利用する場合には配列番号65から70の塩基配列を有する6本の合成DNA(サワディー・テクノロジー社製)を用いて上記と同様の反応を行い、図33に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750LV0(I)を得た。phKM1750LV0(I)に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVL[以下、1750LV0(I)と表記する]の塩基配列を配列番号71およびアミノ酸配列を配列番号94に示した。

(3)既知のヒト抗体のV領域の共通配列を基礎とした抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築

WO97/10354に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93および実施例1の3(1)、(2)で得られた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1732HV0、phKM1732LV0、phKM1750HV0、phKM1750LV0(I)およびphKM1750LV0(IV)を用いて抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターを以下のようにして構築した。

まず、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築について以下に説明する。

プラスミドphKM1732HV0の5μgを10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素Apal(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mMDTT、100μg/mlBSAおよび0.01%トライトンX-100からなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのApal-NotI断片を約0.5μg回収した。

実施例1の2(1)で得られたヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93由来のApal-NotI断片0.1μgと上記で得られたプラスミドphKM1732HV0由来のApal-NotI断片0.1μgを全量10μlの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝

酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図16に示したプラスミド pKANTEX1732HV0を得た。

次に、得られたプラスミド pKANTEX1732HV0 の  $3 \mu$  g を 50mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素 SphI(宝酒造社製)を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.20kb の EcoRI-SphI 断片を約 1  $\mu$  g 回収した。次に、プラスミド phKM1732LV0 の 5  $\mu$  g を 50mM トリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素 SphI(宝酒造社製)を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.39kb の EcoRI-SphI 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。

上記で得られたプラスミド pKANTEX1732HV0 由来の EcoRI-SphI 断片 0.1  $\mu$  g とプラスミド phKM1732LV0 由来の EcoRI-SphI 断片 0.1  $\mu$  g を全量 10  $\mu$  l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換し、図17に示した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター pKANTEX1732HV0LV0を得た。

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1750 に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクターの構築についても、上記と同様の反応を行い、図18および図34に示した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター pKANTEX1750HV0LV0(IV)および pKANTEX1750HV0LV0(I)を得た。

4. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列の解析と FR のアミノ酸を改変した改変型ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクターの作製

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 および KM1750 の V 領域のコンピューター三次元構造モデルおよび実施例1の3項で製造した各抗ヒト

VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のコンピューター三次元構造モデルを構築、比較検討することにより、各抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列と各抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列の間で異なっているアミノ酸残基のうち、各抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列においてヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合に重要と考えられるアミノ酸残基の位置を同定することを検討した。その結果、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体については、VHにおいて配列番号31に記載のアミノ酸配列の 24 位のアラニン、27 位のチロシン、40 位のアラニン、67 位のアルギニン、69 位のスレオニン、70 位のイソロイシン、82 位のグルタミン酸、93 位のバリンの位置が、VLにおいて配列番号45に記載のアミノ酸配列の 39 位のプロリン、45 位のロイシン、46 位のロイシン、69 位のアスパラギン酸、70 位のフェニルアラニンの位置がヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合において重要な役割を果たしていることが考えられた。

また、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1750 に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体については、VHにおいて配列番号38に記載のアミノ酸配列の 3 位のグルタミン、67 位のアルギニン、82 位のグルタミン酸、84 位のセリン、95 位のチロシンの位置が、VLにおいて配列番号 71 に記載のアミノ酸配列の 17 位のアスパラギン酸、18 位のアルギニン、39 位のプロリン、59 位のセリン、69 位のアスパラギン酸、70 位のフェニルアラニンの位置がヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合において重要な役割を果たしていることが考えられた。これらの事実は、上記で述べた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の各アミノ酸残基の位置について、例えば、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体の相当する位置に見い出されるアミノ酸残基への改変を行うことにより、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性を改変できることを示している。

(1) FRのアミノ酸を改変した改変型ヒト型 CDR 移植抗体のVHをコードするcDNA の構築

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1750 に由来する抗ヒト

VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体のH鎖については、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合において重要な役割を果たしていると考える上記に示した5つのアミノ酸残基の中で3残基(82 位のグルタミン酸、84 位のセリン、95 位のチロシン)の位置が特に重要であると考えられるので、KM1750 に見出される対応残基(82 位のグルタミン、84 位のアルギニン、95 位のフェニルアラニン)へ置換したアミノ酸配列をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号 72 から 77 の塩基配列を有する 6 本の合成 DNA (サワディー・テクノロジー社製) を用いて PCR 法により約 0.39kb の MroI-ApaI 断片を回収した。

プラスミド phKM1750HV0 を制限酵素 ApaI および MroI で処理後、約 3.04 kb の ApaI-MroI 断片を回収し、上記で得られた PCR 増幅断片を連結し、得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株(東洋紡績社製)を形質転換した。10 個の形質転換大腸菌より各プラスミドを調製し、実施例1の1項(4)に記載の方法に従って、塩基配列を決定した結果、目的のアミノ酸配列をコードする cDNA を含む図 35 に示したプラスミド phKM1750HV3 を得た。

phKM1750HV3 に含まれる抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の VH (以下、1750HV3 と表記する) の塩基配列を配列番号 78 およびアミノ酸配列を配列番号 95 に示した。

## (2) FR のアミノ酸を改変した改変型ヒト型 CDR 移植抗体の VL をコードする cDNA の構築

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1750 に由来する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の L鎖については、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合において重要な役割を果たしていると考えられる上記に示した6つのアミノ酸残基の中で4残基(17 位のアスパラギン酸、18 位のアルギニン、69 位のアスパラギン酸、70 位のフェニルアラニン)の位置が KM1750LV0(I)においては特に重要であると考えられるので、KM1750 に見出される対応残基(17 位のグルタミン酸、18 位のグルタミン酸、69 位のフェニルアラニン、70 位のチロシン)へ置換したアミノ酸配列をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号 79 から 84 の塩基配列を有する 6 本の合成 DNA (サワディー・テクノロジー

社製)を用いて上記と同様の反応を行い、図36に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750LV4を得た。phKM1750LV4に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVL(以下、1750LV4と表記する)の塩基配列を配列番号85およびアミノ酸配列を配列番号96に示した。

(3)FRのアミノ酸を改変した改変型ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築

実施例1の4(3)で得られた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750HV3、phKM1750LV4、および、実施例1の3(1)、(2)で得られたプラスミドphKM1750HV0、phKM1750LV0(I)、phKM1750LV0(IV)を用いて、FRのアミノ酸を改変した改変型抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターについては、実施例1の3(3)に示した方法と同様の反応を行い、図37、図38、図39および図40に示した改変型抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターpKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4、pKANTEX1750HV3LV4を得た。

KM1750マウスH鎖、KM1750HV0、KM1750HV3のアミノ酸配列を図45に示した。KM1750マウスL鎖、KM1750LV0(I)、KM1750LV(IV)、KM1750LV4のアミノ酸配列を図46に示した。

組換えプラスミドpHKM1750HV0を有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750HV0、組換えプラスミドpHKM1750HV3を有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750HV3、組換えプラスミドpHKM1750LV0(I)を有する大腸菌XL1-Blue/pHKM1750LV0(I)、組換えプラスミドpHKM1750LV0(IV)を有する大腸菌XL1-Blue/pHKM1750LV0(IV)、組換えプラスミドpHKM1750LV4を有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750LV4は、それぞれFERM BP-6719、FERM BP-6720、FERM BP-6716、FERM BP-6717、FERM BP-6718として、平成11年5月12日付けて工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

## 5. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の製造と活性評価

- (1)pKANTEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4お

および pKANTEX1750HV3LV4 を用いた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体のラットミエローマ YB2/0 細胞(ATCC CRL1581)での発現

YB2/0 細胞への抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4 および pKANTEX1750HV3LV4 の導入は実施例1の1(1)に従い、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]にて行った。

実施例1の4項(3)で得られた pKANTEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4 および pKANTEX1750HV3LV4 のそれぞれ  $5 \mu \text{g}$  を  $4 \times 10^6$  個の YB2/0 細胞へ導入後、40ml の RPMI1640-FCS(10) 培地[牛胎児血清(FCS) を 10% 含む RPMI1640 培地(日本水製薬社製)]に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレート(スミロン社製)に  $200 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418(ギブコ社製)を 0.5mg/ml になるように添加してさらに 1~2 週間培養した。G418 耐性を有する形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の活性を実施例1の2項(3)に示した酵素免疫測定法により測定した。

培養上清中に抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の活性が認められた形質転換株については 2 回の限界希釈法によるクローニングを経て、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞株とした。発現ベクター pKANTEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4、pKANTEX1750HV3LV4 をそれぞれ導入して得られた形質転換株、すなわち、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 由来の抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換株の例としてはとてはそれぞれ KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 があげられ、それが生産する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体をそれぞれ KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 と命

名した。得られた各形質転換細胞クローンの抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の生産性は約 0.1~1  $\mu$  g/ml であった。

## (2) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体の培養上清からの精製

実施例1の5(1)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体生産株 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 を 0.5mg/ml G418 を含む GIT 培地(日本製薬社製)に  $1\sim2\times10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、175cm<sup>2</sup> フラスコ(グライナー社製)に 200ml ずつ計 5 本に分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、5~7 日間培養し、コンフルエントになった時点で各培養上清約 1.1~2.5L を回収した。カラムに約 1ml のプロセップ A(バイオプロセッシング社製)を充填し、10ml の 1M グリシン-0.15M NaCl(pH8.6)を用いて 1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体生産株 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 を含む培養上清それぞれ 2.3L、2.5L、1.9L、2.4L、1.1L、2L を 70ml/時の流速でプロセップ A カラムに通塔した。さらに 10ml の 1M グリシン-0.15M NaCl(pH8.6)を用いて 1ml/分の流速で洗浄した後、pH6、pH5、pH4 の 50mM クエン酸緩衝液各 4ml で段階的に洗浄し、50mM クエン酸緩衝液(pH3.0)を 7ml 通塔してヒト型 CDR 移植抗体を溶出した。その結果、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 がそれぞれ 1.1mg、1.8mg、1.6mg、2.2mg、1.3mg、1.6mg 得られた。

精製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 は、実施例1の 2 項(3)に示した SDS-PAGE 法で解析した。還元および非還元条件下でレーンあたりのタンパク質量として 2  $\mu$  g の抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555、実施例1の 2 項(4)で示した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 およびコントロールヒト型 CDR 移植抗体としてヒト IgG1 タイプで、ガングリオシド GM2 に反応し、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応しない KM8969(特開平 10-257893)をそれぞれ泳動し、クーマシープリリアントブルーにて染色した。その結果を図41に示した。ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 は、非還元条件下では分子量約 150 キロダルトンに IgG

のバンドが認められ、還元条件下では約 50 キロダルトンに H 鎖のバンドが、約 25 キロダルトンに L 鎖のバンドが認められた。この結果は、IgG 型の抗体は、還元条件下では分子間ジスルフィド結合が切断され、それぞれ 2 本の H 鎖および L 鎖に分解し、非還元条件下ではそれぞれ 2 本の H 鎖および L 鎖より構成される分子量 150 キロダルトンの分子として存在することと一致し、ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 は正しい構造の抗体分子であることが示された。

(3) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植キメラ抗体のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性

精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性を実施例1の 2 項(5)の手順に従い、確認した。

プレートにコートする Flt-1 7N は  $2 \mu \text{g/ml}$  に固定し、精製抗体濃度を 1.23～900ng/ml まで変化させた(3 倍希釈系列)。

その結果を図42に示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 は抗体濃度依存的にヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N に結合した。また、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 の結合活性はほぼ同等であった。従って、本発明の 6 種のヒト型 CDR 移植抗体はヒト型キメラ抗体 KM2550 の有する結合活性を保持していることが明らかとなつた。

次に、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 の結合特異性を検討するために、5 種類の可溶性ヒト VEGF 受容体誘導体タンパク質 Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N (WO98/22616)、Flt-1 7N.K2[実施例1の 2(6-5)]、KDR 7N[実施例1の 2(6-5)]に対する反応性を酵素免疫測定法を用いて検討した。96 ウェルの EIA 用プレートに吸着させる可溶性ヒト VEGF 受容体誘導体蛋白

質の濃度は  $10 \mu \text{ g/ml}$  (3 倍希釈系列) に、抗体濃度は  $5 \mu \text{ g/ml}$  に固定した。

その結果を図43に示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 は全て同等の反応特異性を示し、Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N に反応し、Flt-1 7N.K2、KDR 7N には全く反応しなかった。陰性コントロール抗体である抗GM2ヒト型 CDR 移植抗体 KM8969 (特開平 10-257893) はいずれの可溶性ヒト VEGF 受容体誘導体蛋白質にも反応しなかった。従って、本発明の 6 種のヒト型 CDR 移植抗体はヒト型キメラ抗体 KM2550 の有する結合特異性を保持していることが明らかとなった。

次に、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を実施例1の 2 項 (5) に記載した方法に従い検討した。添加する抗体濃度は  $0.0048 \sim 15 \mu \text{ g/ml}$  (5 倍希釈系列) とした。その結果を図44に示す。図44に示したように抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型 CDR 移植抗体 KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555 および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2550 は抗体濃度依存的にヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合を阻害した。また、従って、本発明で確立した 6 種のヒト型 CDR 移植抗体はヒト型キメラ抗体 KM2550 の有する VEGF-Flt-1 結合阻害活性を保持していることが明らかとなった。

## 参考例1

### 1. 抗原の調製

#### (1) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の N 末端アミノ酸から 1～338 番目 (シグナル配列を含む) に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 断片 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の細胞外領域の N 末端側から 3 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の完全長 cDNA をコードする cDNA クローン flt#3-7

[Oncogene, 5, 519, (1990)]を EcoRI と TaqI の両制限酵素により部分切断し、5'末端から 1263bp の EcoRI-TaqI DNA 断片を回収し、バキュロウイルス遺伝子組み換えベクター pVL1393 プラスミド(インビトロジエン社製)のポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 EcoRI および 3' 側 NotI 部位に、人為的に終始コドンを導入した TaqI-NotI アダプター(配列番号53および配列番号54に示した塩基配列を有する合成DNA)を用いて組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体 Flt-1 3N 発現ベクター pVL1393/Flt 3N を作製した(図19)。

#### (2) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の N 末端アミノ酸から 1~750 番目(シグナル配列を含む)に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の細胞外領域の 7 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

配列番号55および配列番号56に示した塩基配列を有するプライマー10 pmol、  
flt#3-7 クローン[Oncogene, 5, 519, (1990)]DNA 10 ng、および、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸(deoxyribonucleotide triphosphates)を含む 10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V)ゼラチン溶液 100 μl に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95°C で 5 分間の前処理した後に、95°C で 90 秒間、50°C で 90 秒間、最後に 72°C で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)を 30 回繰り返し、DNA 断片を回収した。この DNA 断片を HindIII (flt#3-7 クローンで 1893bp の位置) と NotI により切断し、610 bp の HindIII-NotI DNA 断片、すなわち flt#3-7 クローンで 1894~2499bp 断片と終始コドンおよび NotI 認識配列を含む DNA 断片を回収した。次に、flt#3-7 クローンを EcoRI と HindIII の両制限酵素により切断し、5'末端から 1893 bp の EcoRI-HindIII 断片を回収した。続いて、610 bp の HindIII-NotI DNA 断片、および、1893 bp の EcoRI-HindIII 断片をバキュロウイルス遺伝子組み換えベクター pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 EcoRI および 3' 側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N 発現ベクター pVL1393/Flt 7N を作製した(図20)。

#### (3) 昆虫細胞による可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現を行うための組み換えウィルス

## の作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウィルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーべクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウィルスとトランスファーべクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウィルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーミンジエン社製バキュロゴールドスター キット(製品番号 PM-21001K)を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

TMN-FH インセクトメディウム(ファーミンジエン社製)にて培養した昆虫細胞 Sf9 (ファーミンジエン社製)に線状バキュロウィルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA(BaculoGold baculovirus DNA)、ファーミンジエン社製]および作製したトランスファーべクターDNA をリポフェクチン法にて導入すること[蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)]により行い組み換えバキュロウィルスを以下のように作製した。

(2) で作製した pVL1393/FIt7N あるいは(1)で作製した pVL1393/FIt3N の  $1 \mu g$  と線状バキュロウィルス DNA の 20ng とを  $12 \mu l$  の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン  $6 \mu l$  と蒸留水  $6 \mu l$  とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $1 \times 10^6$  個を 2ml の Sf900-II 培地[ギブコ(Gibco) 社製]に懸濁し、直径 35mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA 、線状バキュロウィルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え 27°C で 3 日間培養後、組み換えウィルスを含む培養上清 1ml を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地 1ml を加え、さらに 27°C で 3 日間培養し組み換えウィルスを含む培養上清をさらに 1.5ml 得た。

次に蛋白発現に用いるために得られた組み換えウィルスを以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞  $2 \times 10^7$  個を 10ml の Sf900-II 培地に懸濁し、 $175 \text{cm}^2$  フラスコ(グライナー社製)に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに 15ml の TMN-FH インセクトメディウムと上記の組み換えウィルスを含む培養上清のうち 1ml を加え 27°C で 3 日間培養した。培養後上清を  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力価をバキュロゴールドスター

一キット・マニュアル(ファーミンジエン社製)に記載の方法で算定した。

Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 4ml の Sf900-II 培地に懸濁し、直径 60mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地 400  $\mu$ l と Sf900-II 培地で 10,000 倍に希釀した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き 5ml の 1% 低融点アガロース[アガープラーカ・アガロース(Agarplaque Agarose)、ファーミンジエン社製]を含む培地[滅菌した 1ml の 5%アガープラーカプラス・アガロース水溶液と 4ml の TMN-FH インセクトメディウムを混和し、42°Cに保温したもの]を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27°Cで 6 日間培養した。該シャーレに 0.01% ニュートラルレッドを含む PBS1ml を加えさらに 1 日培養した後、出現したプラーカの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約  $1 \times 10^7$  PFU /ml のウィルスを含んでいることがわかった。

#### (4) 昆虫細胞における可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の発現、精製

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ(グライナー社製)に EX-CELL™400 培地 (JRH Bioscience 社製)30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。(3)で得られたトランスファーベクター pVL1393/Flt 7N および pVL1393/Flt 3N 由来の組み換えウィルスを約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU /ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™400 培地 30ml を加え 27°Cにて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムに約 60ml のヘパリンーセファロース CL-6B ゲル[ファルマシア・バイオテック (Pharmacia Biotech) AB 社製]を充填し、600ml の 20mM トリスー塩酸(pH7.5)緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調整した可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を含む培養液 1000ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 600ml の 20mM トリスー塩酸(pH7.5)を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、濃度勾配が 0 M~1.1M の NaCl

含有 20mM トリスー塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を 600 ml 通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に 8ml ずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析し、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を含む分画を 60~80ml 回収し、セントリプレッピング (アミコン社製)を用いて濃縮した。濃縮後、可溶性のヒト Flt-1 7N および Flt-1 3N を溶液としてそれぞれ 5ml および 13 ml (蛋白質濃度は 331  $\mu$  g/ml および 204  $\mu$  g/ml) 得た。

#### (5) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の純度の確認

精製可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-17N および Flt-1 3N の純度を SDS-PAGE を用いて確認した。SDS-PAGE は文献記載の方法 [Anticancer Research, 12, 1121 (1992)] に従った。ゲルには 5~20% グラジエントゲル (アトー社製) を用い、還元条件下でレーンあたりの蛋白質量として 2  $\mu$  g の Flt-1 7N および Flt-1 3N をそれぞれ泳動し、クーマシーブリリアントブルーにて染色した。図21に結果を示した。Flt-17N および Flt-1 3N の純度は 95% 以上であった。

#### (6) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の対照抗原蛋白質の精製

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の対照抗原蛋白質 (ネガティブコントロール蛋白質) は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に EX-CELL™400 培地 (JRH Bioscience 社製) 30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させ、27°C にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し 1,500 × g で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムにヘパリンーセファロース CL-6B ゲル [ファルマシア・バイオテック (Pharmacia Biotech) AB 社製] 約 20ml を充填し、200ml の 20mM トリスー塩酸(pH7.5)緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製した High Five 細胞の培養液 500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 200ml の 0.2M NaCl を含む 20mM トリスー塩酸(pH7.5)を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、1M NaCl を含む 20mM トリスー塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を 200 ml 通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質を溶出した。1M NaCl 溶出画分をセントリプレッピング (アミコン社製)を用いて濃縮し対照抗原蛋白質を溶液として 7 ml (蛋白質濃度として 867  $\mu$  g/ml) 得た。

## (7) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N のヒト VEGF 結合活性の確認

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N のヒト VEGF 結合活性を以下の手順により確認した。

96 ウェル・イムオビロン<sup>TM</sup>-P フィルトレーション・プレート(96-well Immobilon<sup>TM</sup>-P Filtration Plate ; ミリポア社製)にメタノールを 100  $\mu$  l/ ウエルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS 希釀 2  $\mu$  g/ml 可溶性ヒト Flt-1 7N を 50  $\mu$  l/ ウエルで分注し、4°C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 % 牛血清アルブミン(BSA) を含む PBS を 100  $\mu$  l/ ウエル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、(4)で取得した精製可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を 50  $\mu$  l/ ウエルで分注し(最終濃度 1~1000 ng/ml)、さらに、<sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF(最終濃度 3ng/ml: アマシャム社製)を 50  $\mu$  l/ ウエル加え、室温で 1.5 時間反応させた。0.05% Tween-PBS で洗浄後、50°C にてウエルを乾燥させ、マイクロシンチ-O(パッカード社製)を 20  $\mu$  l/ ウエル加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウエルに結合した <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を図22に示す。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N は濃度依存的に <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF の可溶性ヒト Flt-1 7N への結合を阻害することが示された。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N は同程度のヒト VEGF 結合活性を示したことから、ヒト VEGF は Flt-1 3N 部分(シグナル配列を含む N 末端アミノ酸から 1 から 338 番目)に結合することが明らかとなつた。

## (8) 昆虫細胞におけるヒト VEGF の発現

ヒト VEGF は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ(グライナー社製)に EX-CELL<sup>TM</sup>400 培地(JRH Bioscience 社製)30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。文献[Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)]記載の方法により得られたヒト VEGF 組み換えバキュロウィルス溶液を約 1~3  $\times 10^8$  PFU/ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL<sup>TM</sup>400 培地 30ml を加え 27°C にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し 1,500 × g で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムに約 40ml のヘパリンーセファロース CL-6B グル[ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB 社製]を充填し、400ml の 20mM トリス-塩酸(pH7.5) からな

る緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製したヒト VEGF を含む培養液 1500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 400ml の 20mM トリスー塩酸(pH7.5)を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、0.2M 、0.5M および 1M の NaCl 含有 20mM トリスー塩酸(pH7.5)からなる緩衝液各 120 ml を順次通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質を段階的に溶出を行うと共に 8ml ずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、ヒト VEGF を含む分画(0.5~1 MNaCl 画分)を 120ml 回収した。セントリプレップ-10(アミコン社製)で濃縮後、ヒト VEGF を溶液として 4ml (蛋白質濃度 1.2 mg/ml) 得た。

## 2. 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

1(4)より得られた各種抗原 50  $\mu$  g をそれぞれアルミニウムゲル 2mg および百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1  $\times$  10<sup>9</sup> 細胞とともに 5 週令雌 BALB/c(日本SLC社製)、B6C3F1 マウス(日本チャールズリバー社製)あるいは雌 SD ラット(日本SLC社製)に投与し、2 週間後より 10~50  $\mu$  g の蛋白質を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。また、NIH3T3-Flt-1 細胞 1  $\times$  10<sup>7</sup> 個を 5 週令雌 BALB/c(日本SLC社製)3匹に投与し、計6回投与した。眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスあるいはラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。なお、NIH3T3-Flt-1 細胞を投与した 5 週令雌 BALB/c では免疫がかからず、可溶性 Flt-1 7N に対する抗体価は上昇しなかった。

脾臓を MEM 培地(日本水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(1,200rpm、5 分間)した後、上清を捨て、トリスー塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で 1 ~2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

## 3. 酵素免疫測定法

1(4)で得られた可溶性ヒト Flt-1 7N および Flt-1 3N を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として、1(4)の昆虫細胞培養上清より得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を用いた。96 ウェルの EIA 用プレート(グライナー社製)に、PBS 希釀 1 ~10  $\mu$  g/ml 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N、Flt-1 3N および対照抗原として 1(6)で得られた High Five 細胞培養上清のヘパリンカラム吸着画分を、それぞれ 50  $\mu$  l/ウェル

で分注し、4 °Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 %牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSを100  $\mu$ l/ ウェル加え、室温1時間反応させて残っている活性基をプロックした。1%BSA-PBSを捨て、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清およびハイブリドーマの培養上清を50  $\mu$ l/ウェルで分注し2時間反応させた。0.05%Tween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンあるいはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン(ともにDAKO社製)を50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温、1時間反応させ、0.05%Tween-PBSで洗浄後ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させOD415nmの吸光度E<sub>max</sub> [モレキュラー・デバイシーズ(Molecular Devices)社製]を測定した。

#### 4. マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に $2 \times 10^7$ 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### 5. ハイブリドーマの作製

2で得られたマウス脾細胞またはラット脾細胞と4で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(1,200rpm、5分間)した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2g、MEM培地2mlおよびDMSO0.7mlの混液0.2~1ml/ $10^8$ マウス脾細胞を加え、1~2分間毎にMEM培地1~2mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにした。遠心分離(900rpm、5分間)後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞をHAT培地100ml中に懸濁した。

この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100  $\mu$ l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで10~14日間培養した。この培養上清を実施例1の2(3)に記載した酵素免疫測定法で調べ、1(4)で得られた可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7NあるいはFlt-1 3Nに特異的に反応し、かつ1(6)で得られた対照抗原に反応しないウェルを選び、さらにHT培地と正常培地に換え、2回クローニングを繰り返して、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株を確立した。以下にその結果を示す。

## 第 3 表

動物	匹数	免疫原	スクリーニング原	スクリーニングしたウエル数	確立したハイブリドーマ数
Balb/cマウス	3	NIH3T3-Flt-1	Flt 7N	-	-
SDラット	1	Flt 7N	Flt 7N	1008	3 (KM1733, 1735, 1736)
Balb/cマウス	1	Flt 7N	Flt 7N	672	5 (KM1737, 1739, 1740, 1742, 1743)
SDラット	1	Flt 7N	Flt 7N	1176	3 (KM1745, 1746, 1747)
B3C3F1マウス	1	Flt 7N	Flt 3N	672	3 (KM1748, 1749, 1750)
Balb/cマウス	1	Flt 7N	Flt 3N	420	3 (KM1730, 1731, 1732)

1(4)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を免疫した Balb/c マウス 1 匹、あるいは SD ラット 2 匹から得られたハイブリドーマを可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を用いてそれぞれ約 672 ウエルおよび約 2184 ウエルずつスクリーニングした結果、それぞれ 5 クローンおよび 6 クローンの抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を得、これらをそれぞれ KM1737、KM1739、KM1740、KM1742、KM1743 および KM1733、KM1735、KM1736、KM1745、KM1746、KM1747 と命名した。これらのクローンの中で、8 に示したヒト VEGF の Flt-1 結合阻害作用を示すものはなかった。さらに、KM1735、KM1736、KM1742、KM1743 および KM1745 は後記 10 で示す免疫細胞染色法においてヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞と反応したが、KM1730、KM1731 および KM1732 に比較して極めて弱いものであった。

一方、1(4)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を免疫した B3C3F1 マウス 1 匹、および、Balb/c マウス 1 匹から得られたハイブリドーマを 1(4)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N を用いてそれぞれ約 672 ウエルおよび 420 ウエルスクリーニングした結果、それぞれから 3 クローンずつ抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を得、これらをそれぞれ KM1748、KM1749、KM1750 および KM1730、KM1731、KM1732 と命名した。これらクローンの中で後記 8 で示したヒト VEGF の Flt-1 結合阻害作用を示すものとして KM1732、KM1748 および KM1750 の 3 クローンが認められた。さらに、KM1730、KM1731 および KM1732 の 3 クローンは後記 10 で示す免疫細胞染色法においてヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞に極めて強く反応した。モノクローナル抗体の抗体クラスはサブクラスタイピングキット[ザイメント (Zymed) 社製]を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果を以下の第4表に示す。

## 第 4 表

モノクローナル抗体	抗体サブクラス
KM1733	マウス IgG2a
KM1735	ラット IgG1
KM1736	ラット IgG2a
KM1737	マウス IgG1
KM1739	マウス IgG1
KM1740	マウス IgG1
KM1742	マウス IgG1
KM1743	マウス IgG1
KM1745	ラット IgG2a
KM1746	ラット IgG1
KM1747	ラット IgG1
KM1748	マウス IgG2b
KM1749	マウス IgG1
KM1750	マウス IgG2b
KM1730	マウス IgG1
KM1731	マウス IgG2a
KM1732	マウス IgG1

本発明で確立したモノクローナル抗体はすべて IgG クラスであった。

#### 6. モノクローナル抗体の精製

ブリストン処理した 8 週令ヌード雌マウス (Balb/c) に 5 で得られたハイブリドーマ株を  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞／匹それぞれ腹腔内に注射した。10～21 日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまつたマウスから、腹水を採取 (1 ～8 ml/ 匹) し、遠心分離 (3,000rpm、5 分間) して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法 (アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

#### 7. モノクローナル抗体の特異性の確認

5 で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の特異性を 3 に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

結果を図23に示す。Flt-1 7N を免疫したマウス、ラットよりハイブリドーマを作製し、

Flt-1 7N を用いて選択したモノクローナル抗体(KM1733、KM1735、KM1736、KM1737、KM1739、KM1740、KM1742、KM1743、KM1745、KM1746、KM1747)の中で、KM1740 だけは Flt-1 7N および Flt-1 3N に反応したことから、Flt-1 の N 末端アミノ酸(シグナル配列を含む)から 1～338 番目に存在するエピトープを認識していることが明らかとなった。残りの 10 クローンは、Flt-1 7N には反応するが Flt-1 3N には反応しないことから、Flt-1 の N 末端アミノ酸(シグナル配列を含む)から 339～750 番目に存在するエピトープを認識していることが明らかとなった。一方、Flt-1 7N を免疫したマウスよりハイブリドーマを作製し、Flt-1 3N を用いて選択した 6 種のモノクローナル抗体(KM1748、KM1749、KM1750、KM1730、KM1731、KM1732) はすべて、Flt-1 7N および Flt-1 3N に反応したことから、Flt-1 の N 末端アミノ酸(シグナル配列を含む)から 1～338 番目に存在するエピトープを認識していることが明らかとなった。

#### 8. 抗 Flt-1 モノクローナル抗体によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性の確認

5 で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体のヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を以下の手順に従い確認した。

96 ウェル・マルチスクリーン-IP プレート(96-well MultiScreen-IP Plate; ミリポア社製)にメタノールを 100  $\mu$  l/ ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS で 1.6  $\mu$  g/ml の濃度に希釈した可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を 50  $\mu$  l/ ウェルで分注し、4 °C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% 牛血清アルブミン(BSA) 含有 PBS を 50  $\mu$  l/ ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、ハイブリドーマの培養上清あるいは 0.5M NaCl を含む 1% BSA-PBS 溶液で希釈した精製モノクローナル抗体(0.01～7.29  $\mu$  g/ml)を 50  $\mu$  l/ ウェルで分注し、さらに、3ng/ml の  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF(アマシャム社製)を 50  $\mu$  l/ ウェル加え室温で 1.5 時間反応させた。0.05% Tween-PBS で洗浄後、50°C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-O(パッカード社製)を 30  $\mu$  l/ ウェル加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

ハイブリドーマの培養上清の活性を検討した結果を図24 に示す。確立した 17 種のモノクローナル抗体の中で、3 種のモノクローナル抗体 KM1748、KM1750、KM1732

が、それぞれ阻害率 62.6%、66.3%、83.1%でヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合を阻害した。

通常、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング方法としては、免疫原に用いた抗原と同一蛋白質で行う。今回、免疫原として用いた Flt-1 7N で選択された計 11 種のモノクローナル抗体は全く結合阻害活性を示さず、Flt-1 3N で選択された6 種のモノクローナル抗体 (KM1748、KM1749、KM1750、KM1730、KM1731、KM1732) のうち、KM1748、KM1750 および KM1732 については結合阻害活性を示していた。ハイブリドーマのスクリーニングに Flt-1 3N を用いたことにより、結合阻害活性を有するモノクローナル抗体が取得できたことは、予想外の効果であった。そして、Flt-1 3N が結合阻害活性を有するモノクローナル抗体の確立に非常に重要であることが示された。

精製した抗 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732、KM1748、KM1750 を用いて結合阻害活性を検討した結果を図25に示す。KM1732、KM1748、KM1750 は濃度依存的にヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合を阻害した。ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合の 50% 阻害を示す KM1732、KM1748、KM1750 の濃度 (IC50) は  $1.1 \mu \text{g/ml}$ 、 $1.3 \mu \text{g/ml}$ 、 $2.0 \mu \text{g/ml}$  であった。一方、コントロールとして使用したマウス IgG1 クラスである抗シアリルルイス A モノクローナル抗体 KM231 [Anticancer Research, 10, 1579 (1990)] は全く阻害活性を示さなかった。

## 9. 抗 Flt-1 モノクローナル抗体によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞の結合阻害活性の確認

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732、KM1748 および KM1750 によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を以下の手順に従い確認した。

96 ウエル・マルチスクリーン-HV プレート (96-well MultiScreen-HV Plate; ミリポア社製) に 1 % 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を  $100 \mu \text{l}$  / ウエル加え、室温 1 時間反応させてウエル中の活性基をブロックし、0.05%  $\text{NaN}_3$  を含む 1% BSA-PBS に懸濁した NIH3T3-Flt-1 細胞を  $5 \times 10^4$  個 / ウエル加えた。1% BSA-PBS で洗浄後、精製モノクローナル抗体 (0.01~ $7.29 \mu \text{g/ml}$ ) を  $50 \mu \text{l}$  / ウエルで分注し、さらに、3ng/ml の  $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF (アマシャム社製) を  $50 \mu \text{l}$  / ウエル加え、氷上で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、50°C にてウエルを乾燥させ、マイクロシンチ-O (パッカード社

製)を  $30 \mu \text{l}$  /ウェル加え、トップカウント(パックカード社製)を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

精製した抗 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732、KM1748、KM1750 を用いて結合阻害活性を検討した結果を図26に示す。KM1732、KM1748、KM1750 は濃度依存的にヒト VEGF と NIH3T3-Flt-1 細胞への結合を阻害した。ヒト VEGF と NIH3T3-Flt-1 細胞の結合の 50% 阻害を示す KM1732、KM1748、KM1750 の濃度 (IC50) は  $0.050 \mu \text{g/ml}$ 、 $0.037 \mu \text{g/ml}$ 、 $0.041 \mu \text{g/ml}$  であった。一方、コントロールとして使用したマウス IgG1 クラスである抗シアリルルイス A モノクローナル抗体 KM231 は全く阻害活性を示さなかった。

#### 10. モノクローナル抗体のヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞との反応性の確認

5 で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の特異性を免疫細胞染色を用いて以下の手順に従い確認した。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現 NIH3T3 細胞(NIH3T3-Flt-1)、コントロール NIH3T3 細胞(NIH3T3-Neo)[Oncogene, 10, 135 (1995)] $5 \times 10^6$  個を丸底 96 ウェルプレートに免疫細胞染色用緩衝液(1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS)  $100 \mu \text{l}$  に懸濁して分注した。 $4^\circ\text{C}$ 、 $350 \times g$  で 1 分間遠心分離後、上清を除き、ハイブリドーマ培養上清あるいは精製抗体( $10 \mu \text{g/ml}$ ) $50 \mu \text{l}$  を加えて  $4^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。反応後、 $200 \mu \text{l}$  の免疫細胞染色用緩衝液を各ウェルに加え  $4^\circ\text{C}$ 、 $350 \times g$  で 1 分間遠心分離後、上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに 2 回行った後、FITC 標識抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは FITC 標識抗ラットイムノグロブリン抗体(和光純薬社製)を  $1 \mu \text{g/ml}$  の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液  $50 \mu \text{l}$  を加えて  $4^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。反応後、上記と同様の洗浄操作を 3 回行った後フローサイトメーター(コールター社製)を用いて解析を行った。

結果を図27に示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730、KM1731 および KM1732 はコントロール細胞には反応せず Flt-1 発現細胞に特異的に顕著に反応した(A)。また、精製抗体である抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1748( $10 \mu \text{g/ml}$ ) およびハイブリドーマ培養上清 KM1748 もコントロール細胞には反応せず Flt-1 発現細胞に特異的に顕著に反応した(B)。この結果、モノクローナル抗体 KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 は細胞表面上の

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を特異的に認識することが明らかとなつた。一方、KM1735、KM1736、KM1742、KM1743 および KM1745 はヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞と反応したが、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 に比較して極めて弱いものであった。

#### 11. モノクローナル抗体を用いたウエスタンプロット法によるヒト VEGF 受容体 Flt-1 の検出

NIH3T3-Flt-1 細胞、コントロール NIH3T3 細胞(NIH3T3-Neo)より、文献記載の方法 [Cancer Research, 46, 4438 (1986) ]に従い細胞膜成分を調製し、SDS-PAGE 法により泳動した。SDS-PAGE は文献記載の方法 [Anticancer Research, 12, 1121 (1992)] に従い、ゲルには 5~20% グラジエントゲル(アトー社製)を用い、還元条件下でレーンあたりの蛋白質量として 15  $\mu$  g の細胞膜成分を泳動した。泳動された蛋白質を文献記載の方法 [Anticancer Research, 12, 1121(1992)] に従い、PVDF 膜にトランスファーした。続いて、PVDF 膜を 1% BSA を含む PBS に室温で 30 分間反応させプロッキング操作を行い、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1737 の培養上清を 4°C にて 1 晚反応させた。0.05% Tween を含む PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス IgG [5,000 倍希釈:ケミコン(Chemicon)社製]を室温で 2 時間反応させた。0.05% Tween を含む PBS で洗浄し、ECL™ ウエスタンブロッティングディテクションリアージェンツ(ECL™ Western blotting detectionreagents ; アマシャム社製)を用いて、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1737 が結合したバンドを検出した。

図28に結果を示す。抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1737 は、NIH3T3-Flt-1 細胞に発現している分子量 180 キロダルトンのヒト VEGF 受容体 Flt-1 を特異的に検出できることが明らかとなつた。

#### 12. モノクローナル抗体を用いた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の検出

96 ウェルの EIA 用プレート(グライナー社製)に、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732 を PBS で 10  $\mu$  g/ml の濃度に希釈し、50  $\mu$  l/ウェルずつ分注し、4°C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% 牛血清アルブミン(BSA) を含む PBS を 100  $\mu$  l/ ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。

1% BSA-PBS を捨て、1% BSA-PBS で 1000~0.0056ng/ml の濃度に希釈した 1(4)で得

られた精製可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を 4 °C で一晩反応させた。0.05%tween-PBS で洗浄後、公知の方法(酵素抗体法:学際企画刊 1985 年)でビオチン標識した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 を 1 % BSA-PBS で 0.1  $\mu$  g/ml の濃度に希釈して 50  $\mu$  l/ウェルずつ加えて室温にて 2 時間反応させた。0.05%tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS にて 4,000 倍に希釈したアビジン標識ペルオキシダーゼ(ベクター社製)を 50  $\mu$  l/ウェルで加えて室温にて 1 時間反応させた。0.05%tween-PBS で洗浄後 ABTS 基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させ OD415nm の吸光度を  $E_{max}$ (モレキュラーデバイシーズ社製)を用いて測定した。

結果を図29に示す。この結果、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1732 およびビオチン標識抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 を用いることにより可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N は 0.46 ng/ml より、Flt-1 7N は 1.37 ng/ml より測定することができることが明らかとなった。

### 13. 抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を用いた VEGF 依存性細胞遊走抑制試験

in vitro における血管新生活性の指標である VEGF 依存的なヒト血管内皮細胞の遊走活性に及ぼす抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した。

細胞遊走試験は Sato らの方法[J. Cell Biology, 107, 1199 (1988)]に従い行った。3.5cm のディッシュでコンフルエントになるまで培養した HUVEC をカミソリ刃で傷をつけた後 PBS で洗浄した。5%FCS を含む M-199 培地を 1.5ml 加え、さらに VEGF(終濃度 10ng/ml)および 5 で得られた抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 または KM1732(終濃度 0, 1, 10  $\mu$  g/ml)を添加し、24 時間培養した。培養後、傷付けた位置より遊走した細胞数を測定した。

その結果、HUVEC は VEGF 添加により細胞遊走能が上昇したが、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 または KM1732(終濃度 1  $\mu$  g/ml)により完全に遊走が阻害された。従って、Flt-1 は血管内皮細胞の遊走に関わる主な受容体であることが示された。

図47は抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 および KM1732 の血管内皮細胞の遊走阻害活性を比較した結果を示した。モノクローナル抗体濃度 0.1~1

$\mu$  g/mlにおいて2つのモノクローナル抗体は濃度依存的に血管内皮細胞の遊走阻害活性を示した。

以上から、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体により、VEGF により誘導される血管内皮細胞の遊走が完全に阻害されることが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、新生ヒト血管内皮細胞上に特異的に発現されていると考えられるヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体が提供される。また、本発明により、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する中和活性を有する遺伝子組換え抗体が提供される。本発明の遺伝子組換え抗体は癌、糖尿病性網膜症等の血管新生を伴う疾患の診断、治療等に有用であり、特にヒトにおいてはマウスモノクローナル抗体よりも免疫原性が低く、その効果が長期にわたり持続することが期待される。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 17—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 18—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 19—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 20—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 21—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 22—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 23—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 24—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 25—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 26—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 27—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 28—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 29—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 30—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 31—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 32—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 33—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 34—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 35—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 36—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 37—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 38—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 39—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 40—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 41—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 42—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 43—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 44—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 45—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 46—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 47—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 48—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 49—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 50—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 51—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 52—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 53—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 54—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 55—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 56—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 57—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 58—人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号 59—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 60—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 61—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 62—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 63—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 64—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 65—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 66—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 67—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 68—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 69—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 70—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 71—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 72—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 73—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 74—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 75—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 76—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 77—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 78—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 79—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 80—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 81—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 82—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 83—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 84—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 85—人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 86—人工配列の説明:ヒト化抗体重鎖可変領域

配列番号 87—人工配列の説明:ヒト化抗体軽鎖可変領域

配列番号 88—人工配列の説明:ヒト化抗体重鎖可変領域  
配列番号 89—人工配列の説明:ヒト化抗体軽鎖可変領域  
配列番号 90—人工配列の説明:ヒト化抗体重鎖可変領域  
配列番号 91—人工配列の説明:ヒト化抗体重鎖可変領域  
配列番号 92—人工配列の説明:ヒト化抗体軽鎖可変領域  
配列番号 93—人工配列の説明:ヒト化抗体軽鎖可変領域  
配列番号 94—人工配列の説明:ヒト化抗体軽鎖可変領域  
配列番号 95—人工配列の説明:ヒト化抗体重鎖可変領域  
配列番号 96—人工配列の説明:ヒト化抗体軽鎖可変領域

## 請求の範囲

1. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する遺伝子組換え抗体。
2. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端アミノ酸から 750 番目に存在するエピトープを認識する請求の範囲1記載の遺伝子組換え抗体。
3. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端アミノ酸から 338 番目に存在するエピトープを認識する請求の範囲1記載の遺伝子組換え抗体。
4. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 のシグナル配列を含む N 末端アミノ酸から数えて 100～204 番目に存在するエピトープを認識する請求の範囲1記載の遺伝子組換え抗体。
5. ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 Flt-1 への結合を阻害し、かつヒト Flt-1 に対する中和活性を有する請求の範囲1記載の遺伝子組換え抗体。
6. 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体、抗体断片から選ばれる請求の範囲1記載の抗体。
7. ヒト化抗体が、ヒト抗体 IgG 型に属する請求の範囲6記載の抗体。
8. ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である、請求の範囲6記載の抗体。
9. ヒト化抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列または配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を含む請求の範囲8記載のヒト化抗体。
10. ヒト化抗体の抗体軽鎖 (L鎖) V 領域の相補性決定領域が、配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列または配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を含む請求の範囲8記載のヒト化抗体。
11. ヒト型キメラ抗体が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および抗体軽鎖 (L鎖) V 領域と、ヒト抗体の H鎖定常領域 (C領域) および L鎖 C 領域とからなる、請求の範囲8記載のヒト型キメラ抗体。
12. H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1732(FERM BP-5698) またはモノクローナル抗体 KM1750(FERM BP-5700) から選ばれるモノクローナル抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミ

ノ酸配列を有する、請求の範囲11記載のヒト型キメラ抗体。

13. H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号86または88に記載されたアミノ酸配列である、請求の範囲11記載のヒト型キメラ抗体。

14. L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号87または89に記載されたアミノ酸配列である、請求の範囲11記載のヒト型キメラ抗体。

15. H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号86記載のアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号87のアミノ酸配列を含む請求の範囲11記載のヒト型キメラ抗体。

16. H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号88記載のアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号89のアミノ酸配列を含む請求の範囲11記載のヒト型キメラ抗体。

17. ヒトVEGF受容体Flt-1に特異的に反応するヒト型キメラ抗体が、KM2532およびKM2550から選ばれる請求の範囲11記載のヒト型キメラ抗体。

18. 請求の範囲11～17のいずれか1項に記載のヒトVEGF受容体Flt-1に特異的に反応するヒト型キメラ抗体をコードするDNA。

19. 請求の範囲18記載のDNAとタンデムカセットベクターpKANTEX93とを含有する組換えベクター。

20. 請求の範囲19記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

21. 請求の範囲20記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求の範囲11～17記載のヒト型キメラ抗体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

22. ヒト型CDR移植抗体がヒトVEGF受容体Flt-1に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のV領域相補性決定領域と、ヒト抗体のH鎖およびL鎖のC領域およびV領域フレームワーク領域とからなる抗体である請求の範囲8記載のヒト型CDR移植抗体。

23. ヒト型CDR移植抗体のH鎖のV領域相補性決定領域が、配列番号5、6および7または配列番号11、12および13である、請求の範囲22記載のヒト型CDR移植抗体。

24. ヒト型 CDR 移植抗体の L鎖の V 領域相補性決定領域が、配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列または配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列である、請求の範囲22記載のヒト型 CDR 移植抗体。
25. ヒト型 CDR 移植抗体が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域重鎖の相補性決定領域として含み、かつ配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域軽鎖の相補性決定領域として含む、請求の範囲22記載のヒト型 CDR 移植抗体。
26. ヒト型 CDR 移植抗体が、配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域重鎖の相補性決定領域として含み、かつ配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域軽鎖の相補性決定領域として含む、請求の範囲22記載のヒト型 CDR 移植抗体。
27. H鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 90 記載のアミノ酸配列を含み、L鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 92 記載のアミノ酸配列を含む、請求の範囲22記載のヒト型 CDR 移植抗体。
28. H鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 91 または配列番号 95 のアミノ酸配列を含み、L鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 93、配列番号 94 または配列番号 96 のアミノ酸配列を含む、請求の範囲22記載のヒト型 CDR 移植抗体。
29. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554 および KM8555 から選ばれる請求の範囲22記載のヒト型 CDR 移植抗体。
30. 請求の範囲22～29のいずれか1項に記載のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体をコードする DNA。
31. 請求の範囲30記載の DNA とタンデムカセットベクター pKANTEX93 とを含有する組換えベクター。
32. 請求の範囲31記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。
33. 請求の範囲32記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求の範囲22～29記載のヒト型 CDR 移植抗体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

34. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化 Fv からなる群より選ばれるいづれか1つである、請求の範囲6記載の抗体。
35. 一本鎖抗体が、抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域を含む、請求の範囲 34 記載の一本鎖抗体。
36. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求の範囲 35 記載の一本鎖抗体。
37. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求の範囲 35 記載の一本鎖抗体。
38. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列が、配列番号 86 および 87 である、請求の範囲 36 記載の一本鎖抗体。
39. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列が、配列番号 88 および 89 である、請求の範囲36記載の一本鎖抗体。
40. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域重鎖の相補性決定領域として含み、かつ配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域軽鎖の相補性決定領域として含む、請求の範囲 37 記載の一本鎖抗体。
41. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域重鎖の相補性決定領域として含み、かつ配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域軽鎖の相補性決定領域として含む、請求の範囲 37 記載の一本鎖抗体。
42. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 90 記載のアミノ酸配列を含み、L鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 92 記載のアミノ酸配列を含む、請求の範囲 37 記載の一本鎖抗体。
43. 一本鎖抗体の H鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 91 または配列番号 95 のアミノ酸配列を含み、L鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 93、配列番号 94 または配

列番号 96 のアミノ酸配列を含む、請求の範囲 37 記載の一本鎖抗体。

44. ジスルフィド安定化抗体が、抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を含む、請求の範囲 34 記載のジスルフィド安定化抗体。

45. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、それぞれヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求の範囲 44 記載のジスルフィド安定化抗体。

46. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、それぞれヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求の範囲 44 記載のジスルフィド安定化抗体。

47. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 86 および 87 である、請求の範囲 45 記載のジスルフィド安定化抗体。

48. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 88 および 89 である、請求の範囲 45 記載のジスルフィド安定化抗体。

49. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、配列番号 5、6 および 7 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域重鎖の相補性決定領域として含み、かつ配列番号 8、9 および 10 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域軽鎖の相補性決定領域として含む、請求の範囲 46 記載のジスルフィド安定化抗体。

50. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、配列番号 11、12 および 13 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域重鎖の相補性決定領域として含み、かつ配列番号 14、15 および 16 記載のアミノ酸配列を抗体可変領域軽鎖の相補性決定領域として含む、請求の範囲 46 記載のジスルフィド安定化抗体。

51. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 90 記載のアミノ酸配列を含み、L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が配列番号 92 記載のアミノ酸配列を含む、請求の範囲 46 記載のジスルフィド安定化抗体。

52. ジスルフィド安定化抗体の H鎖 V領域のアミノ酸配列が配列番号 91 または配列番号 95 のアミノ酸配列を含み、L鎖 V領域のアミノ酸配列が配列番号 93、配列番号 94 または配列番号 96 のアミノ酸配列を含む、請求の範囲 46 記載のジスルフィド安定化抗体。
53. 請求の範囲1に記載されたヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する遺伝子組換え抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域の CDR から選ばれるアミノ酸配列を含むペプチド。
54. H鎖 V領域および L鎖 V領域の CDR が、配列番号 5、6、7、8、9 および 10 記載のアミノ酸配列から選ばれる少なくとも1アミノ酸配列を含む、請求の範囲53記載のペプチド。
55. H鎖 V領域および L鎖 V領域の CDR が、配列番号 11、12、13、14、15 および 16 記載のアミノ酸配列から選ばれる少なくとも1アミノ酸配列を含む、請求の範囲53記載のペプチド。
56. 請求の範囲1～55 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドが、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合させた融合抗体または融合ペプチドである抗体またはペプチド。
57. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に検出する方法。
58. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に定量する方法。
59. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に検出する方法。
60. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を免疫学的に定量する方法。
61. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。
62. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体または

ペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に定量する方法。

63. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 との結合を阻害する方法。

64. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 機能を中和する方法。

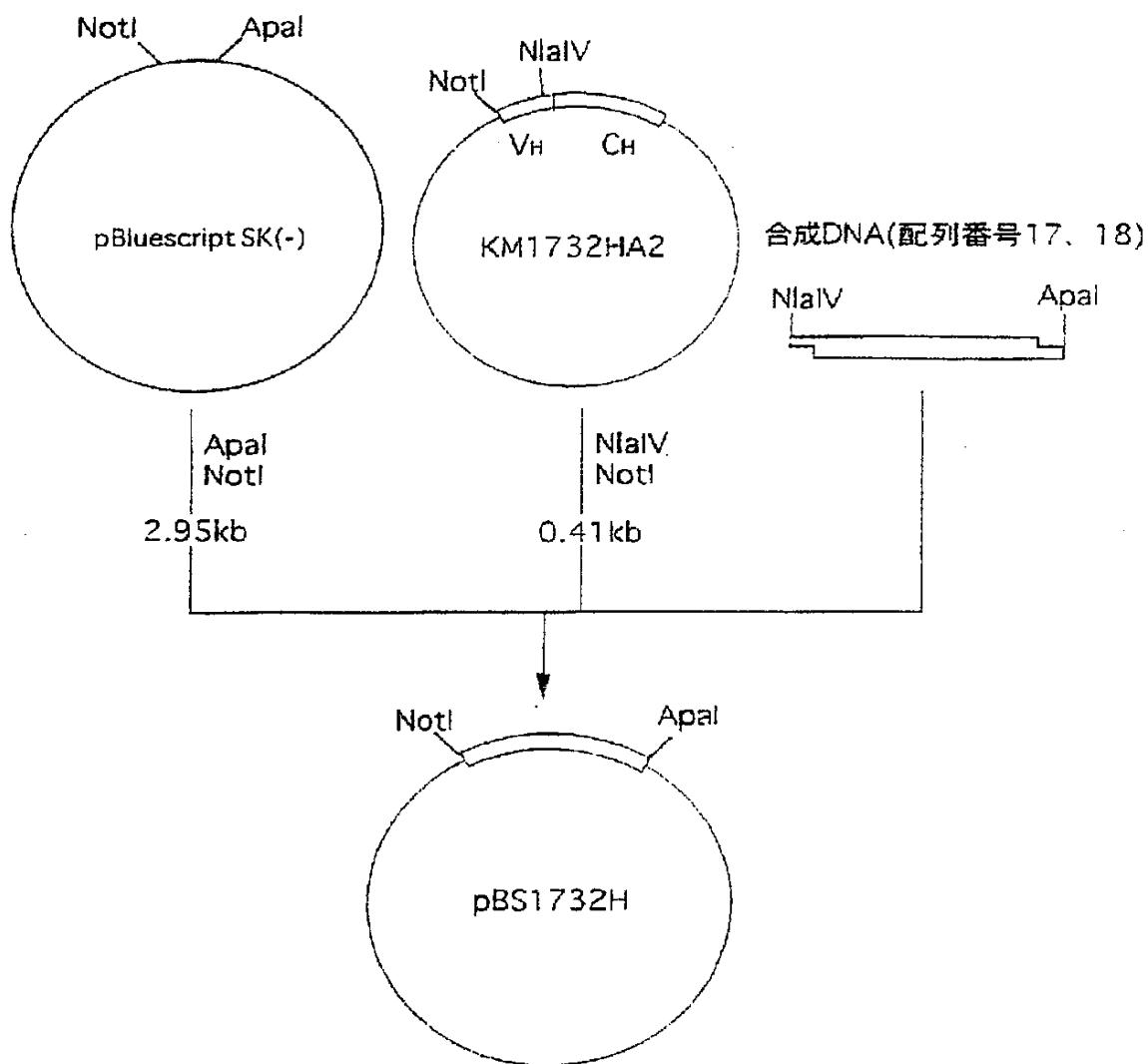
65. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いて、血管内皮細胞の遊走を阻害する方法。

66. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを用いる、血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断方法。

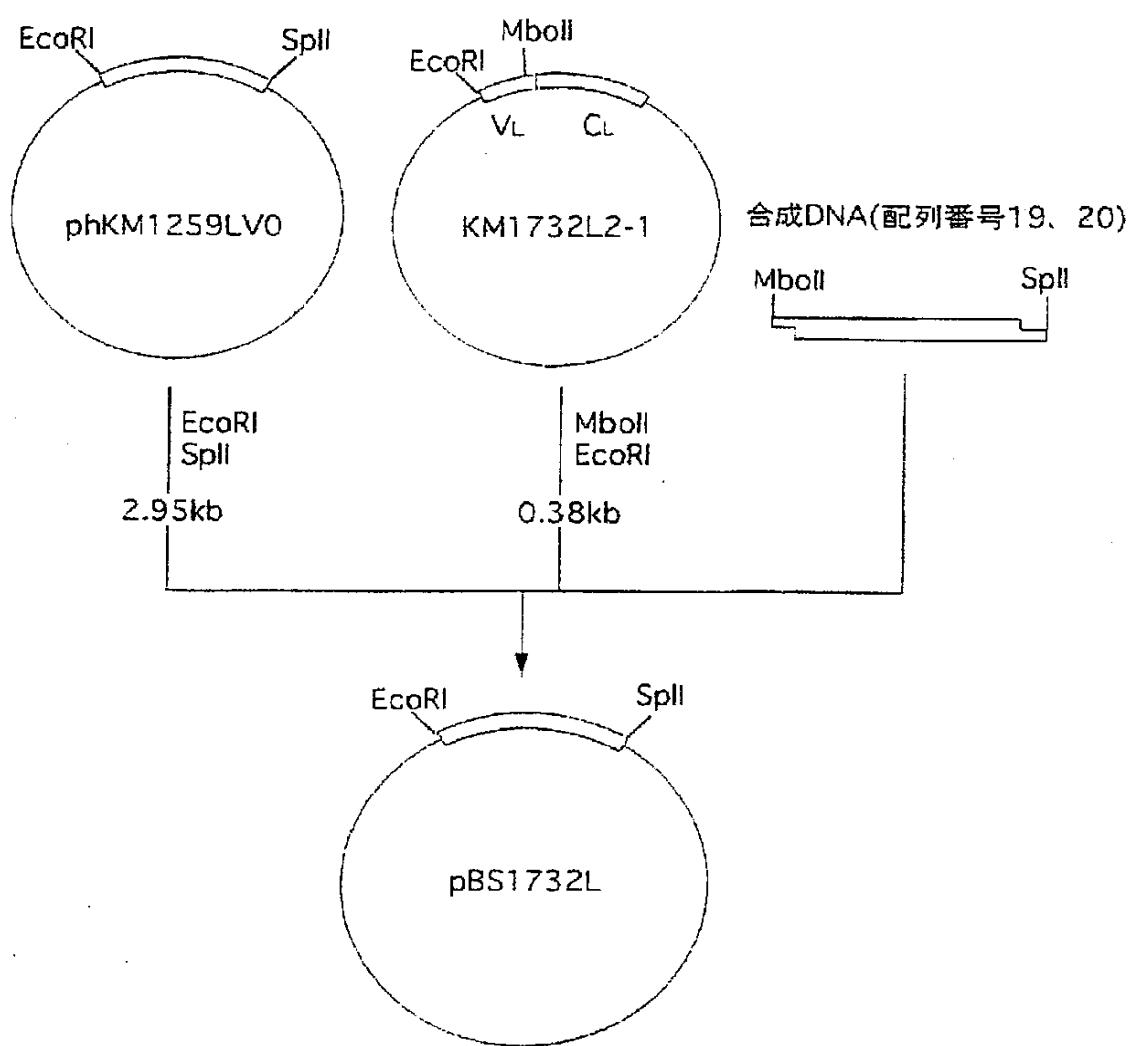
67. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを有効成分として含有する、血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断薬。

68. 請求の範囲1～17、22～29、34～56 のいずれか1項に記載された抗体またはペプチドを有効成分として含有する、血管新生の異常により病態が進行する疾患の治療薬。

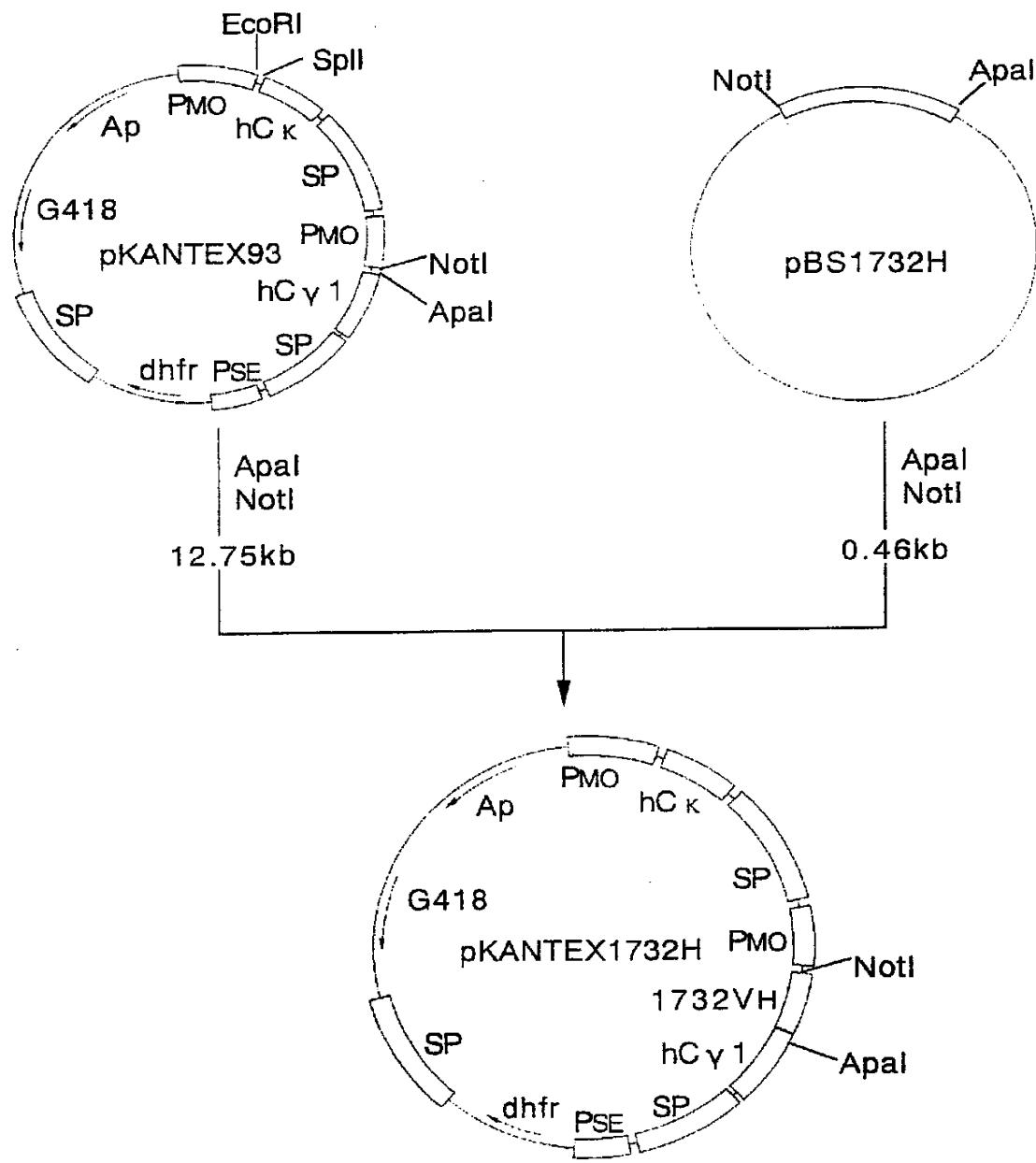
## 第 1 図



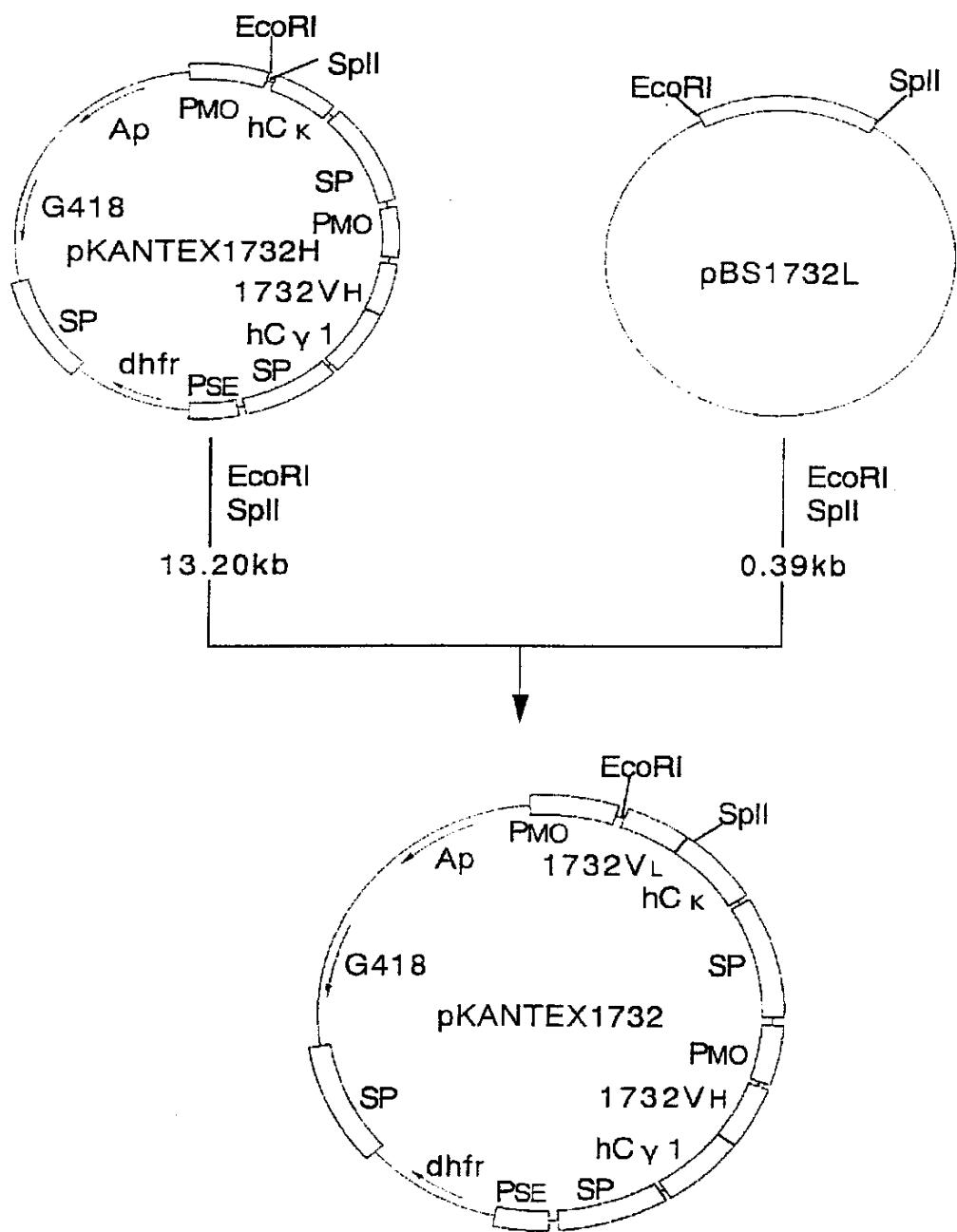
## 第 2 図



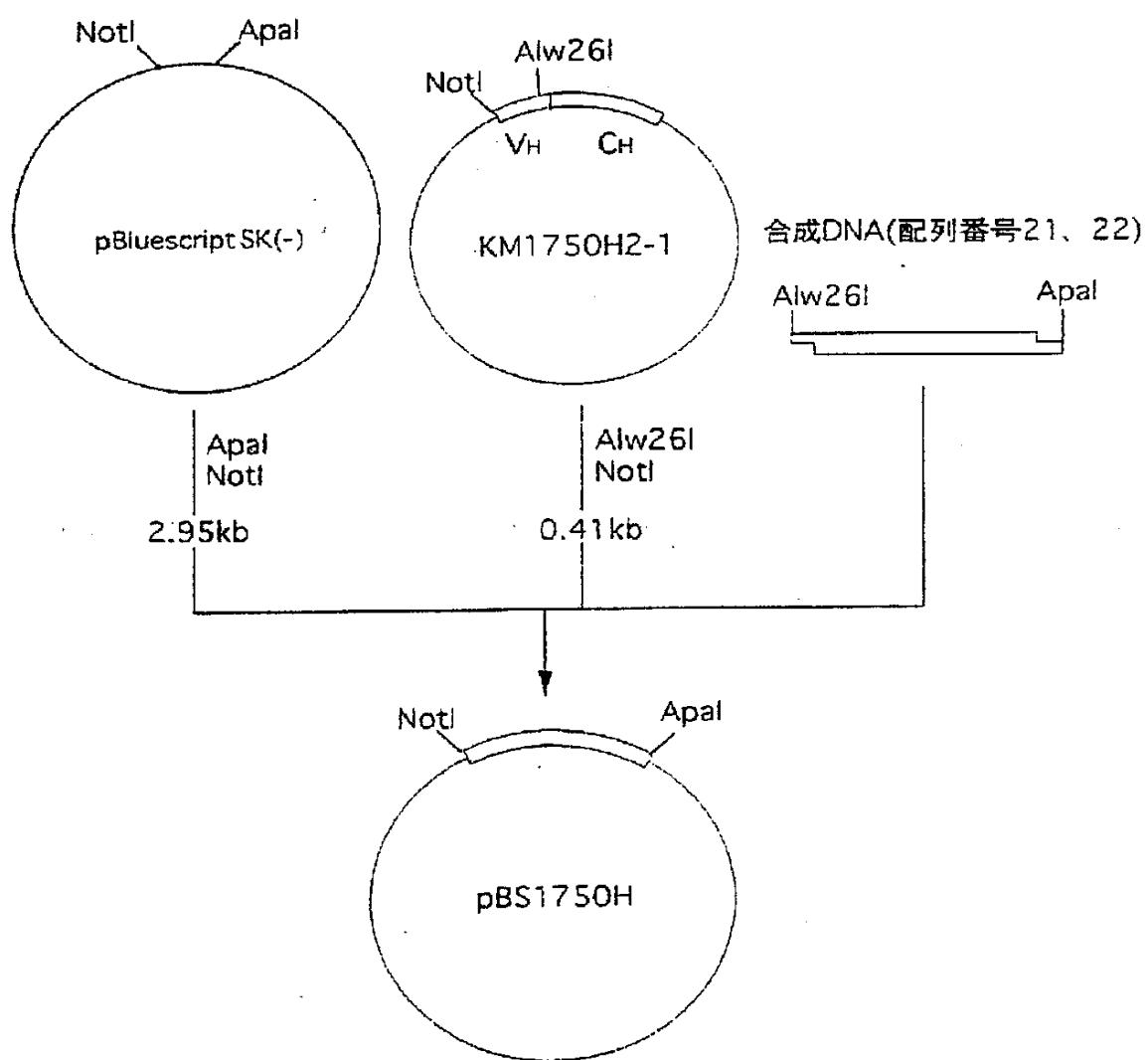
## 第 3 図



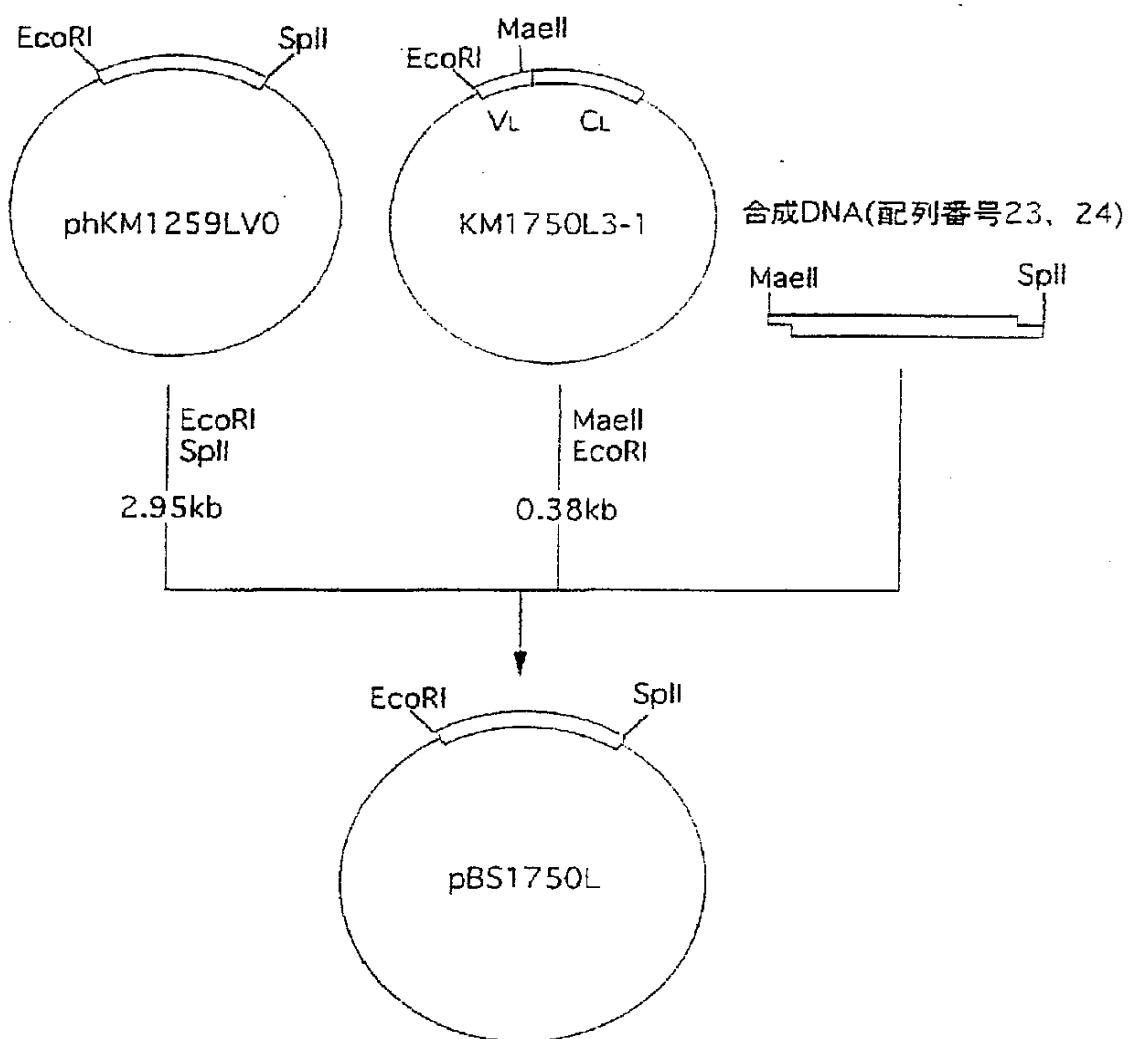
## 第 4 図



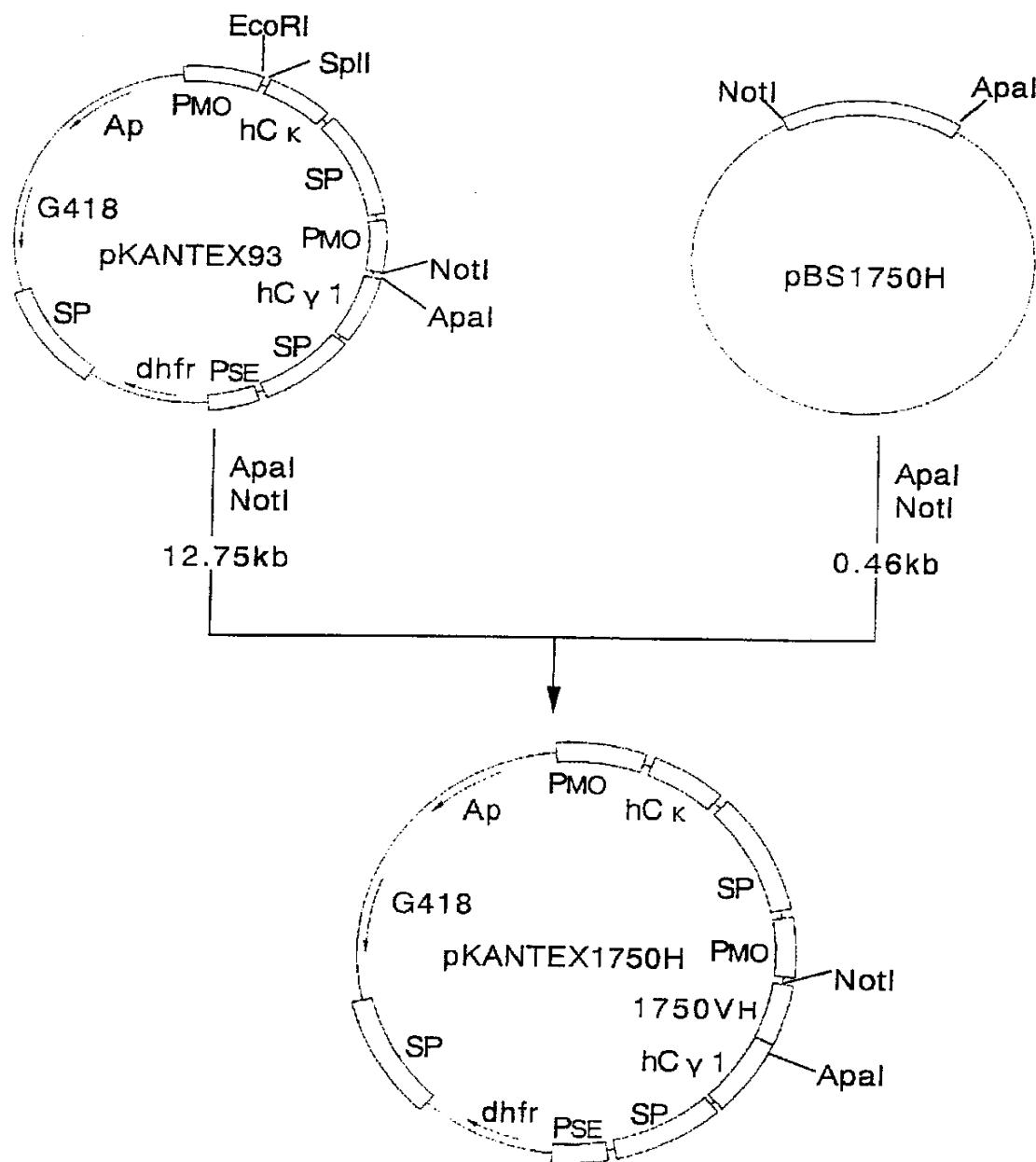
## 第 5 図



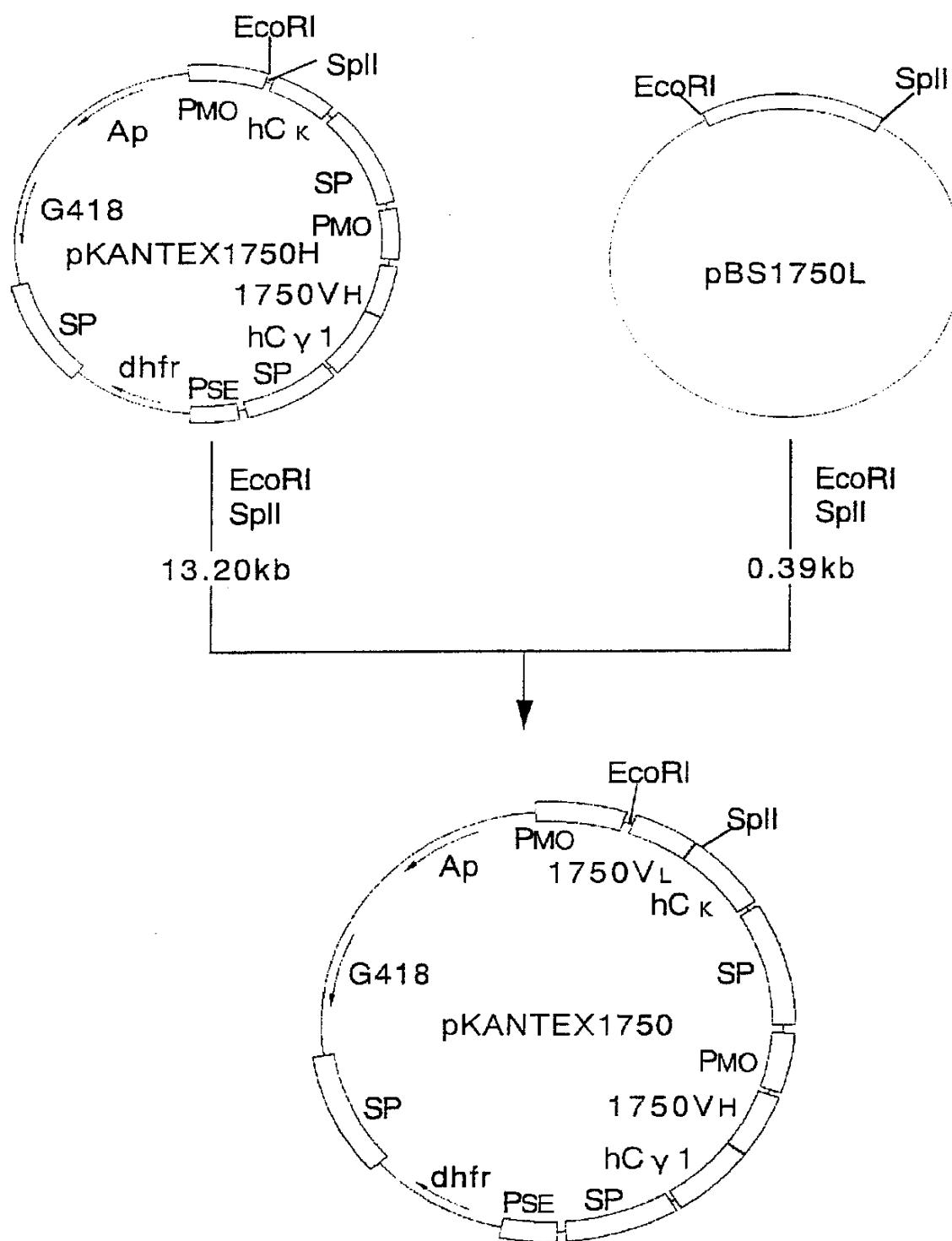
## 第 6 図



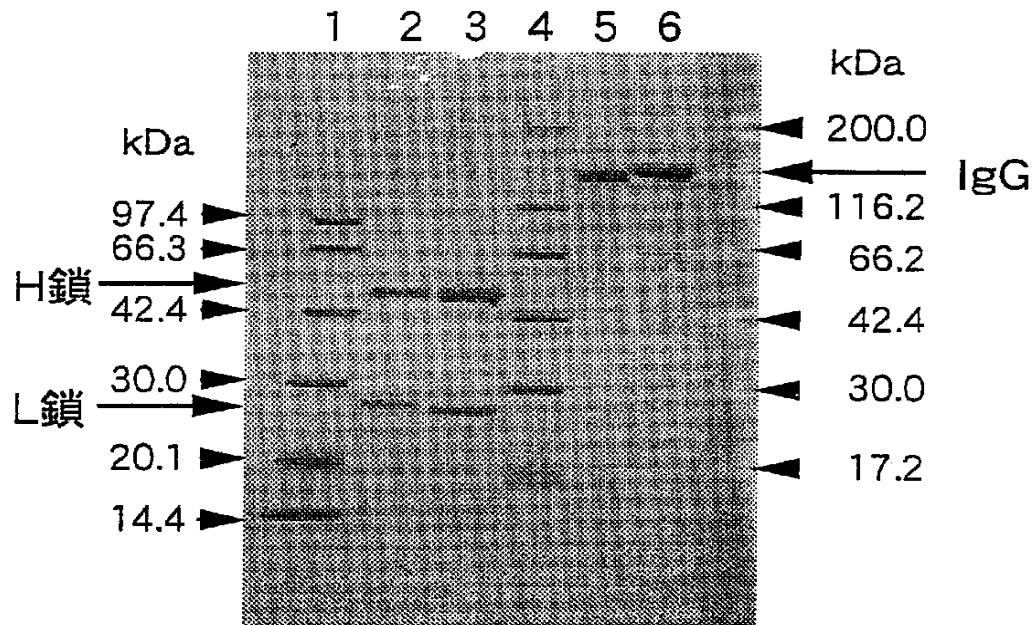
第 7 図



第 8 図

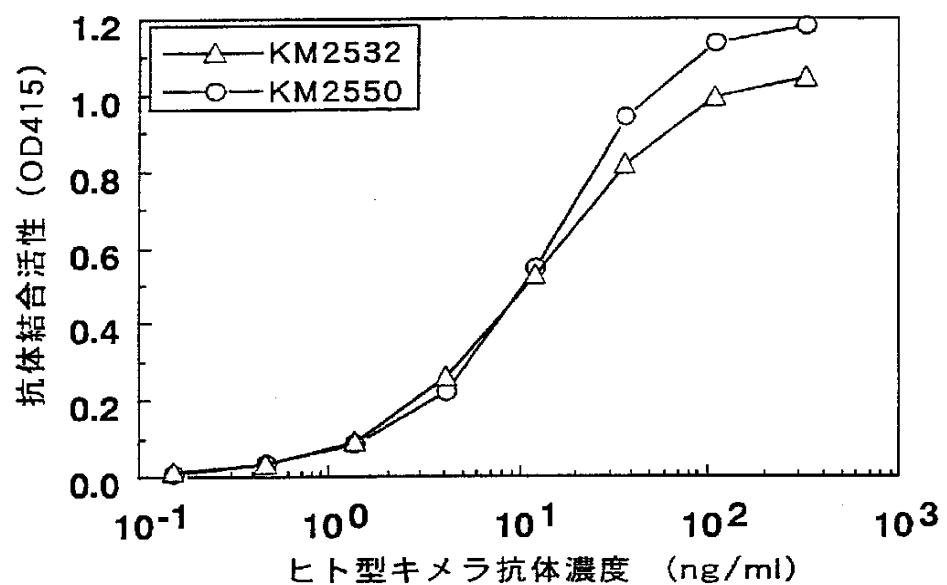
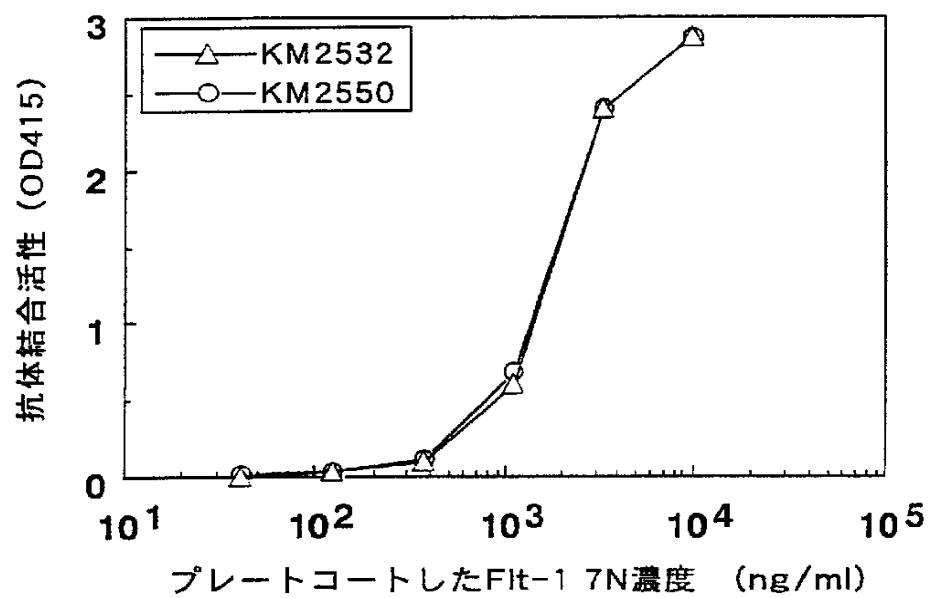


## 第 9 図



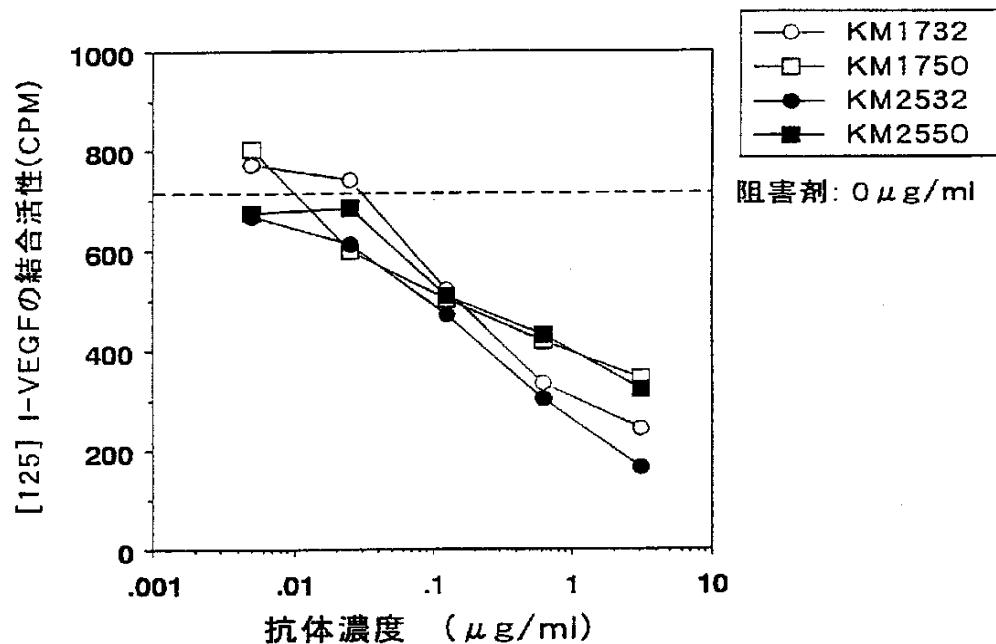
Lane 1 : 分子量マークー、低分子  
2 : KM2532 (還元条件)  
3 : KM2550 (還元条件)  
4 : 分子量マークー、高分子  
5 : KM2532 (非還元条件)  
6 : KM2550 (非還元条件)

第 10 図

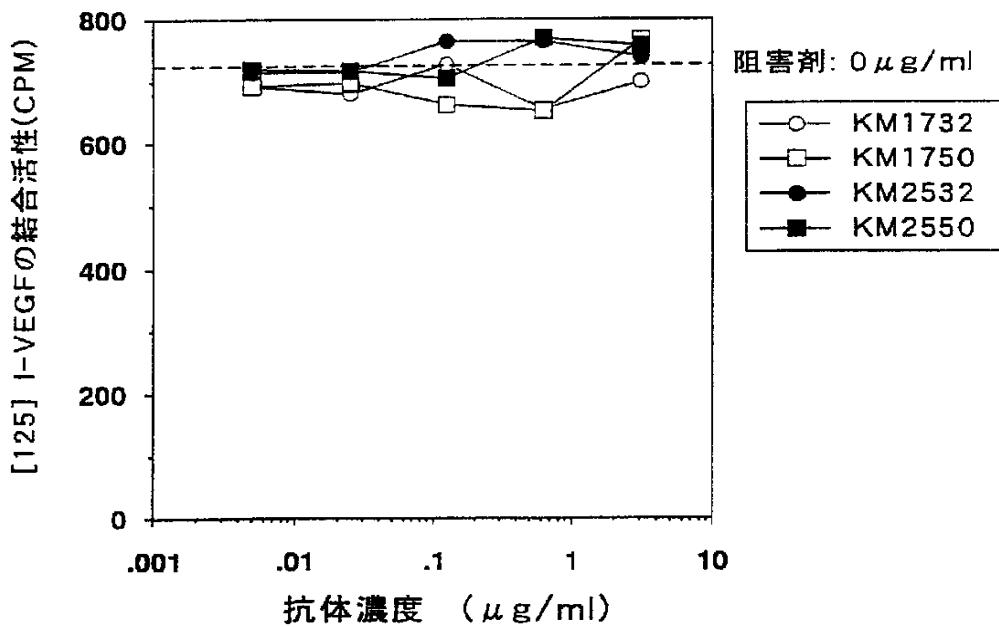
(A) プレートコートしたFlt-1 7N濃度 : 1  $\mu$ g/ml(B) 添加したヒト型キメラ抗体濃度 : 10  $\mu$ g/ml

## 第 11 図

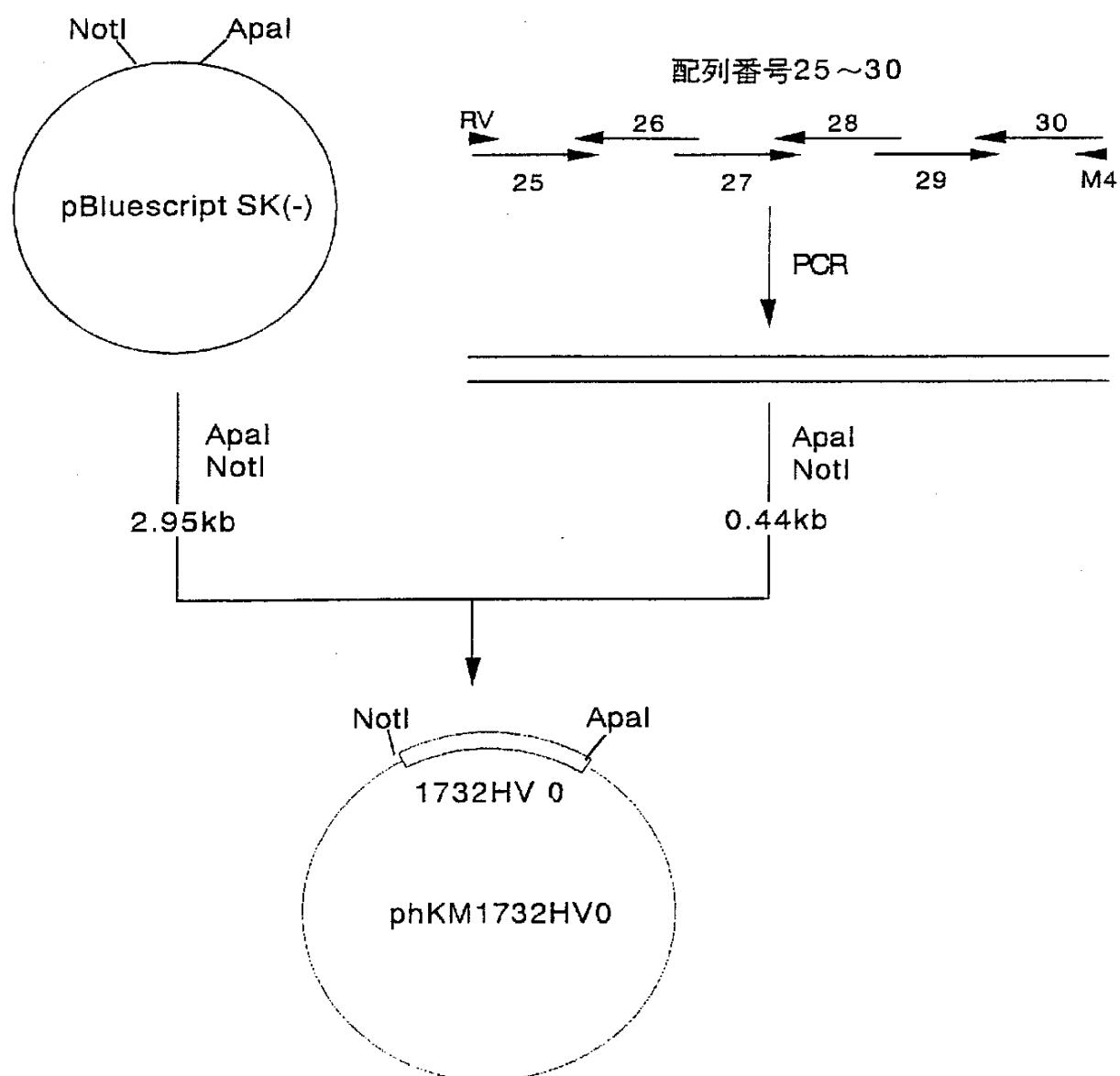
## (A) VEGF-可溶性Flt-1結合実験系



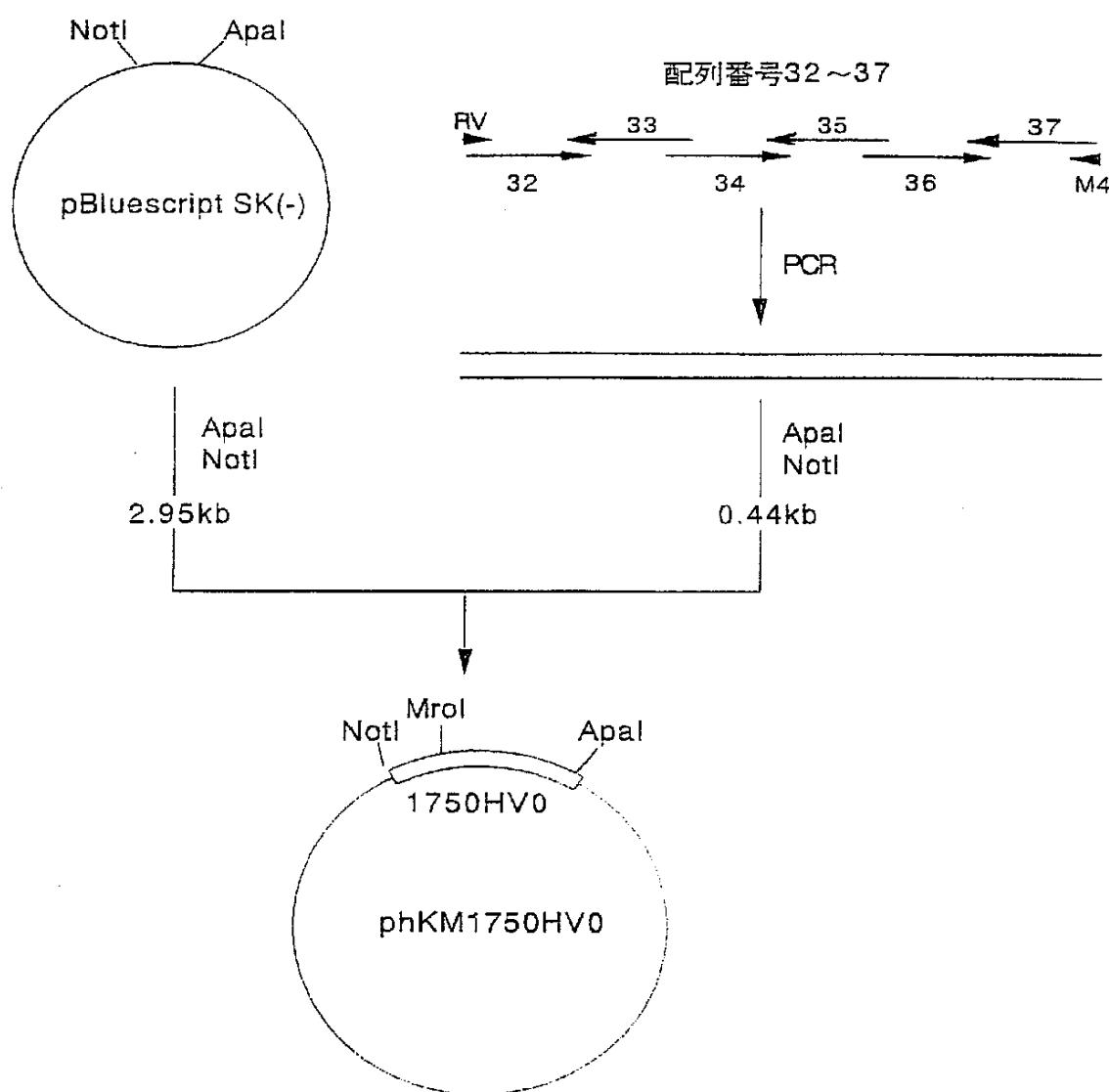
## (B) VEGF-可溶性KDR結合実験系



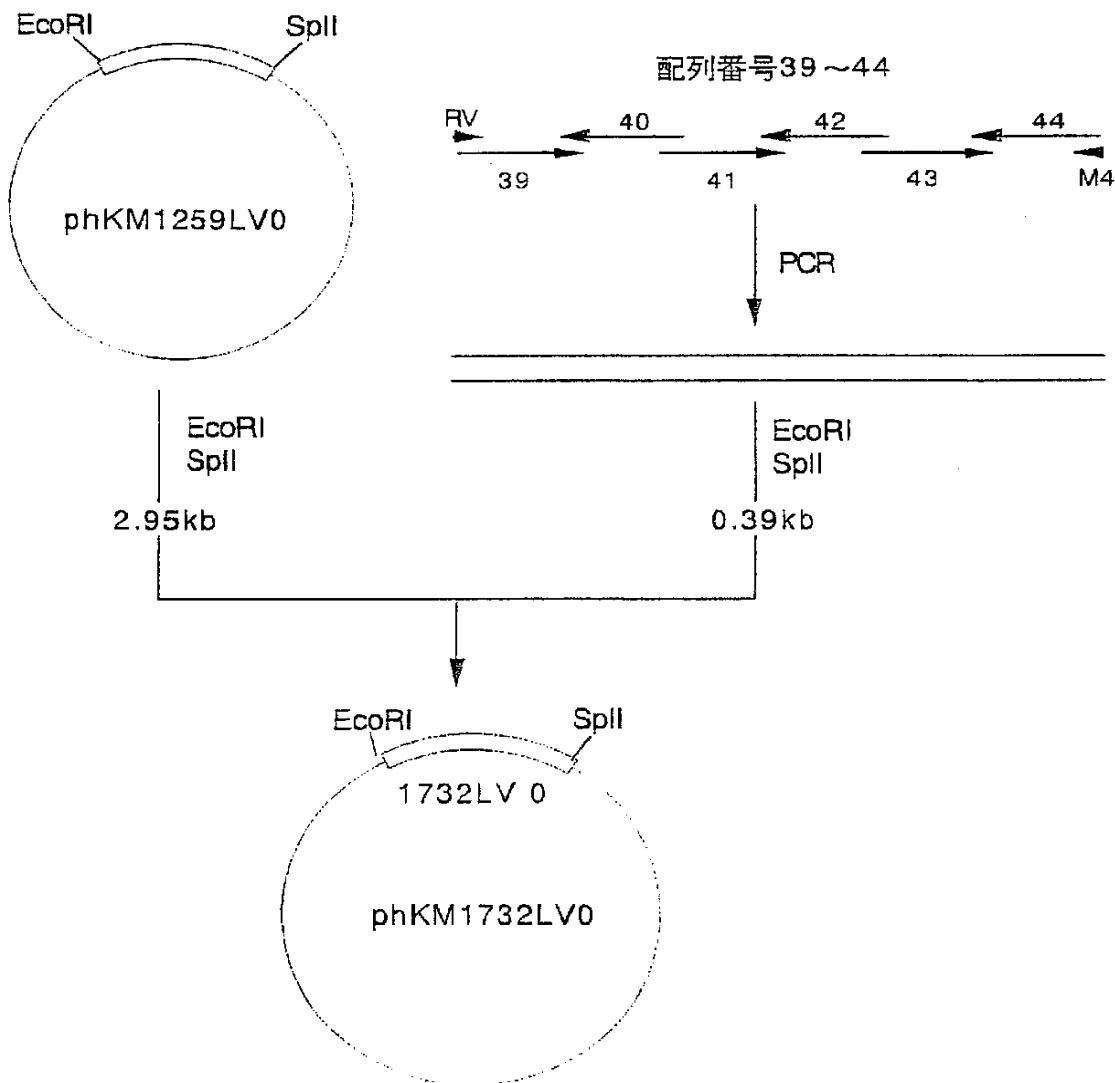
## 第 12 図



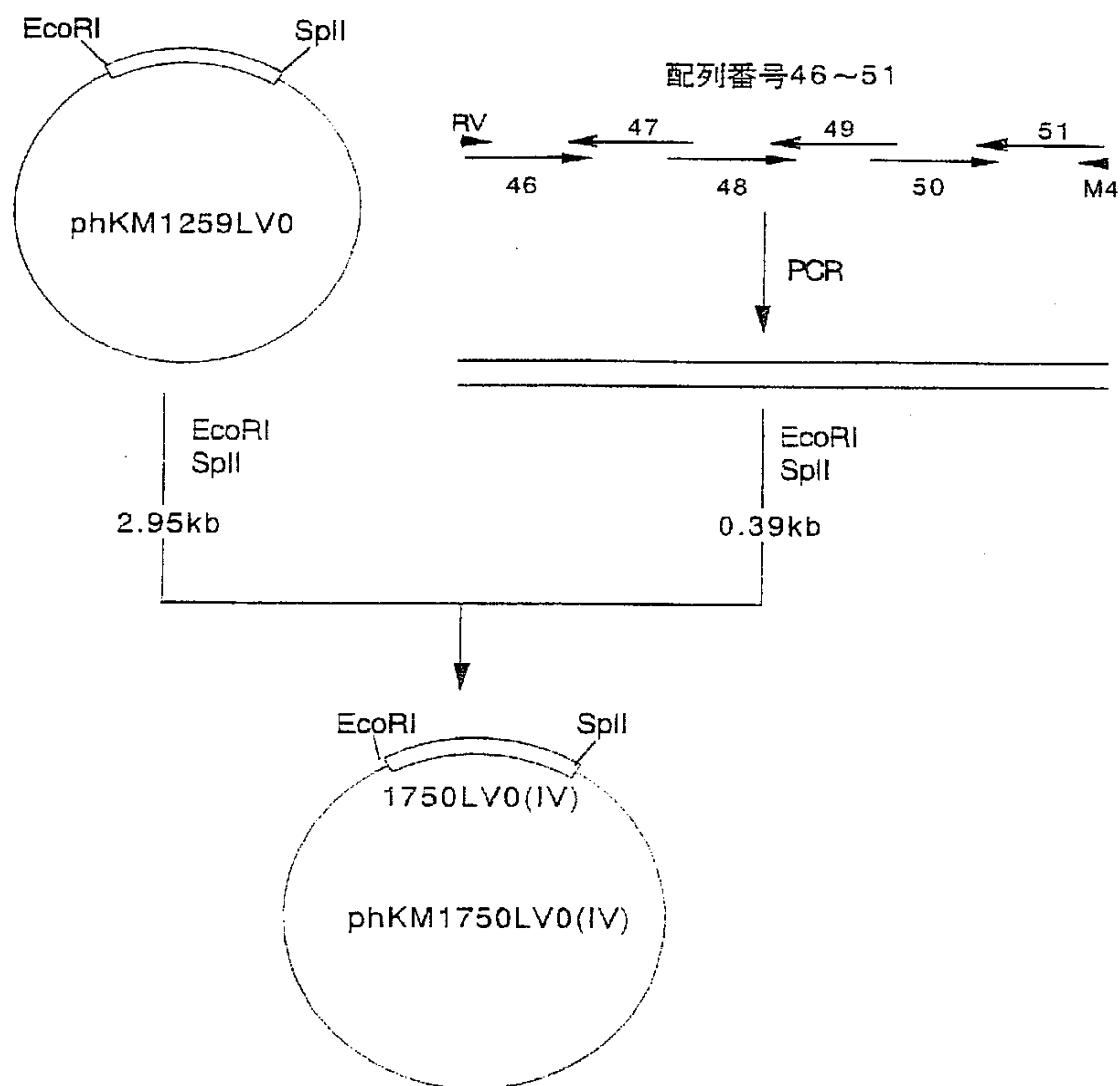
## 第 13 図



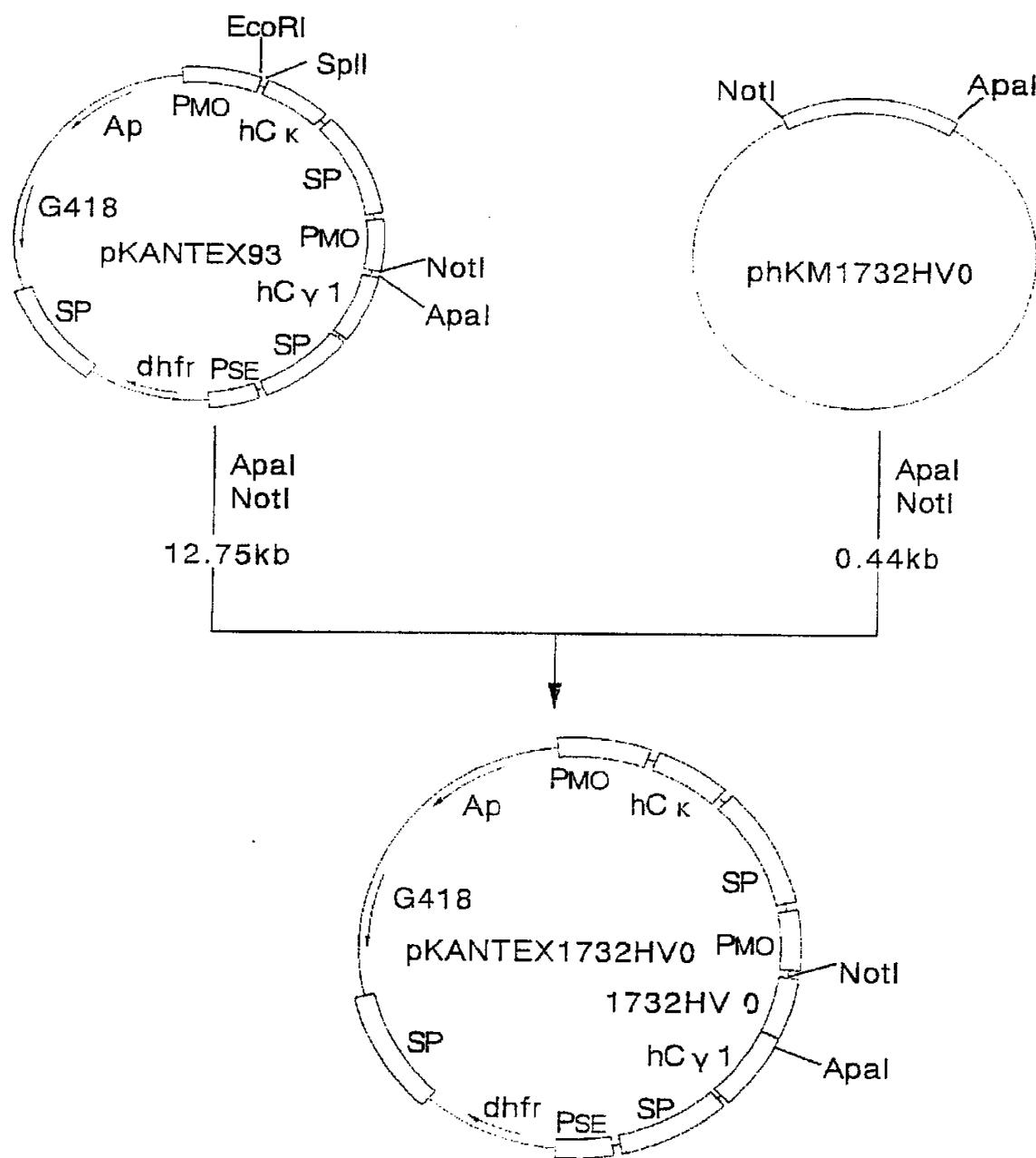
## 第 14 図



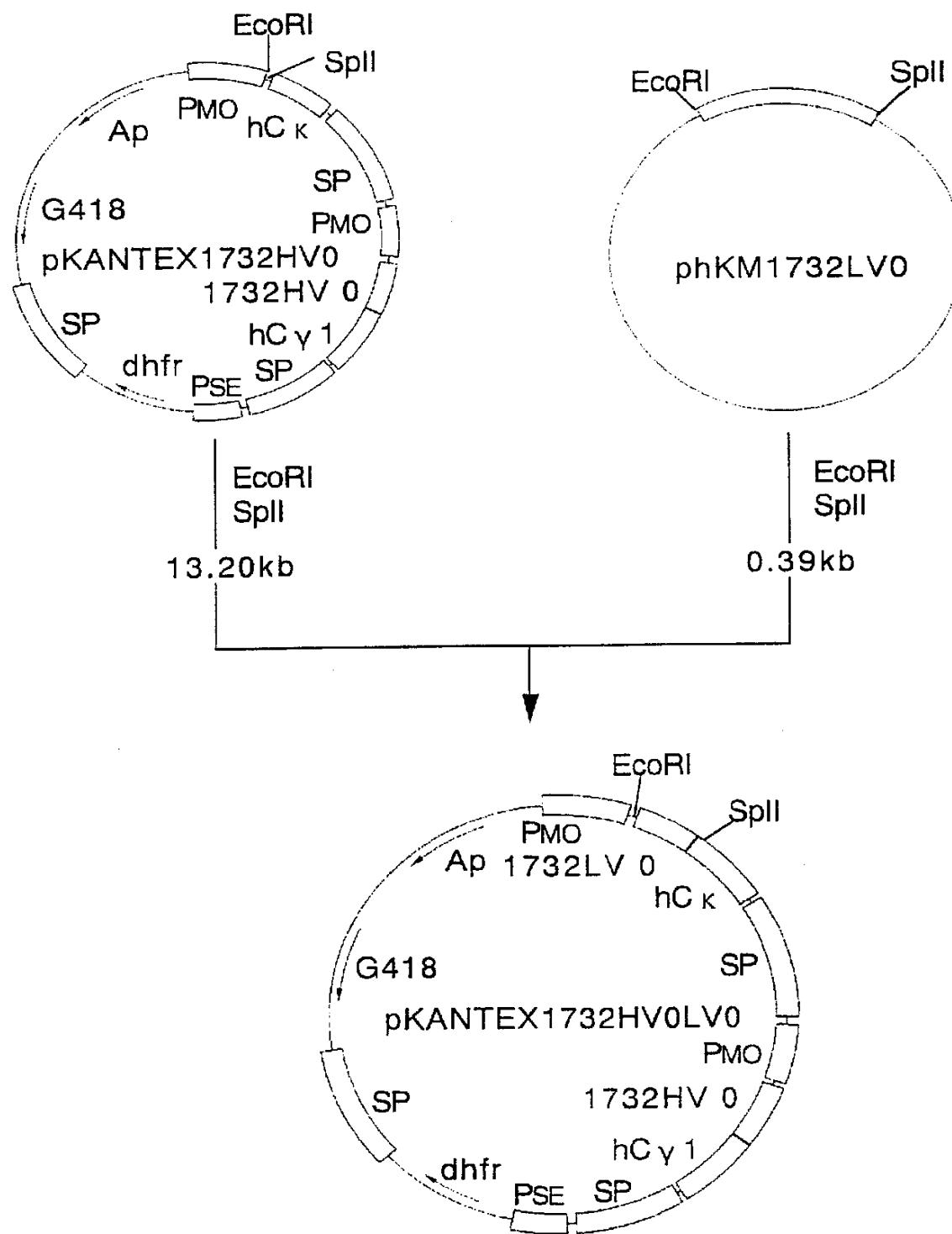
第 15 図



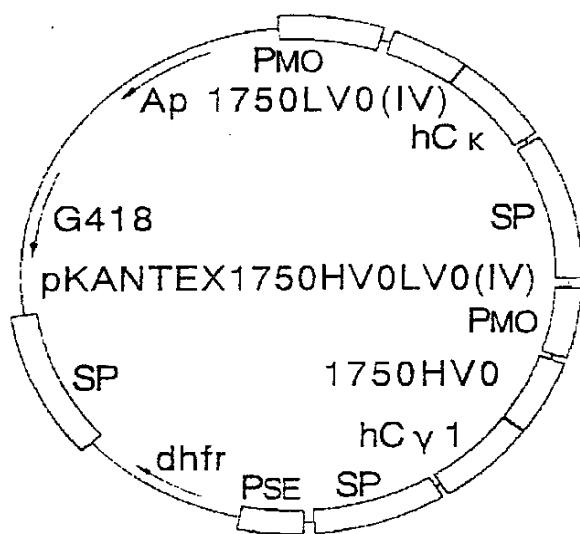
## 第 16 図



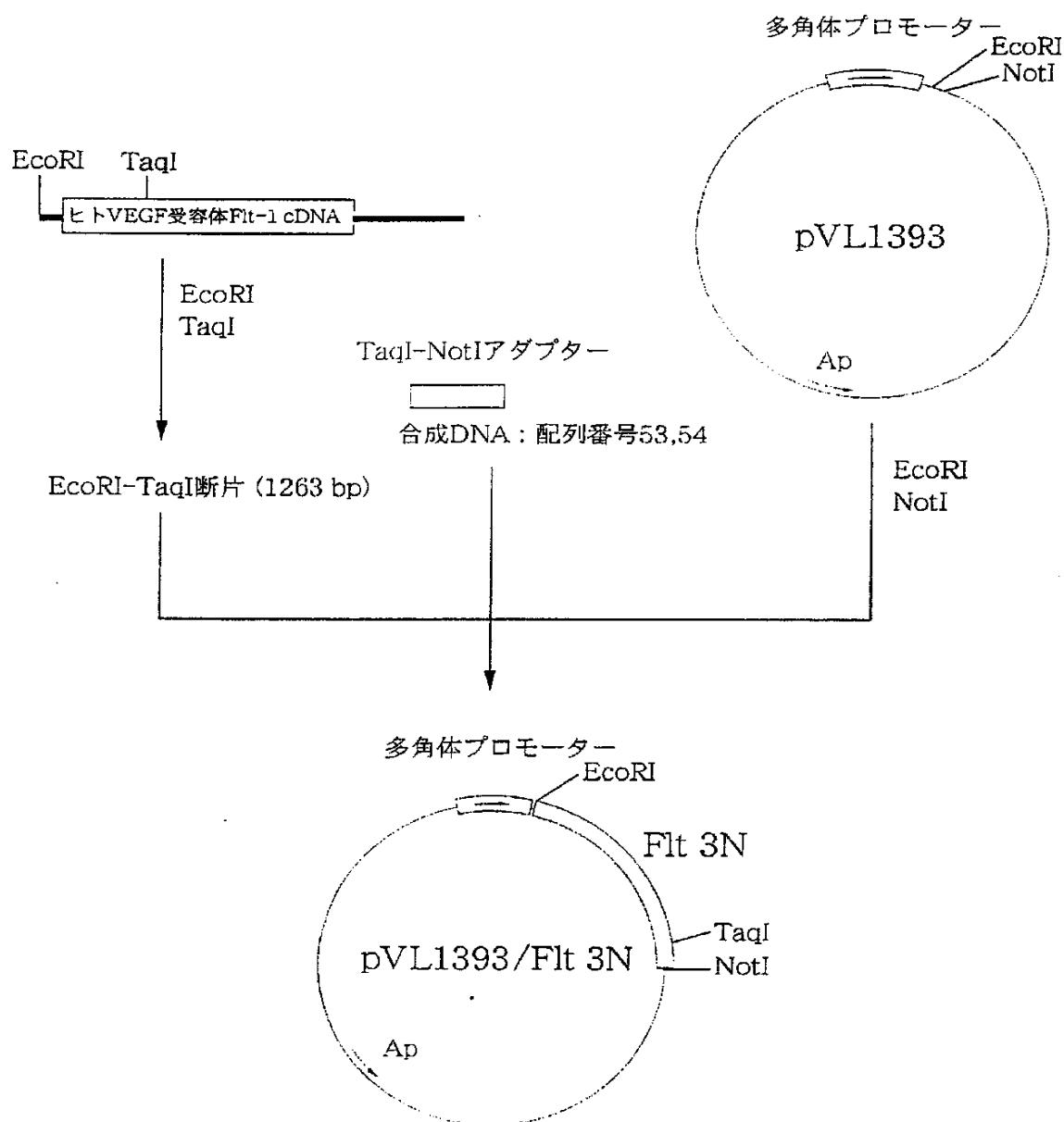
第 17 図



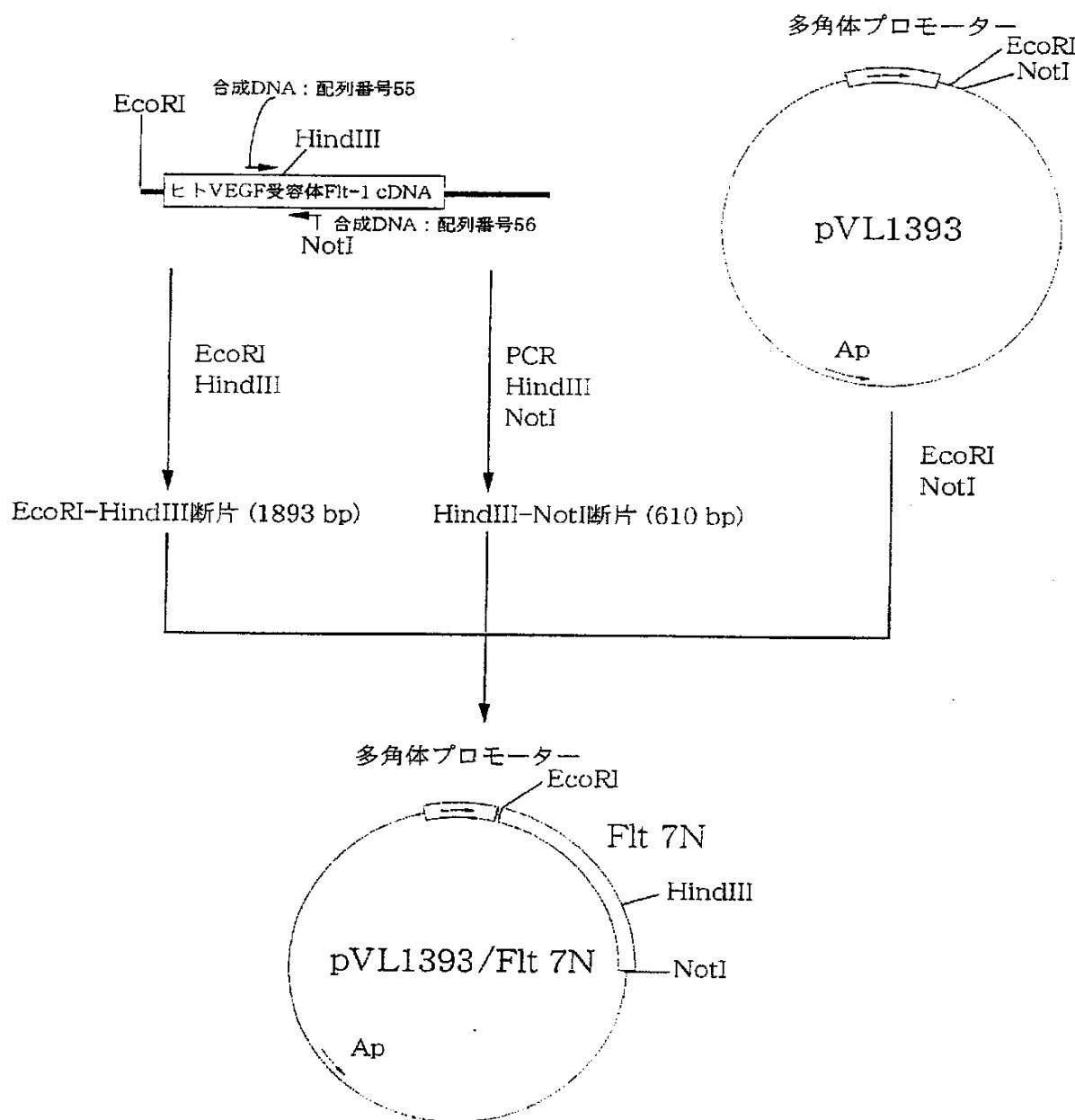
## 第 18 図



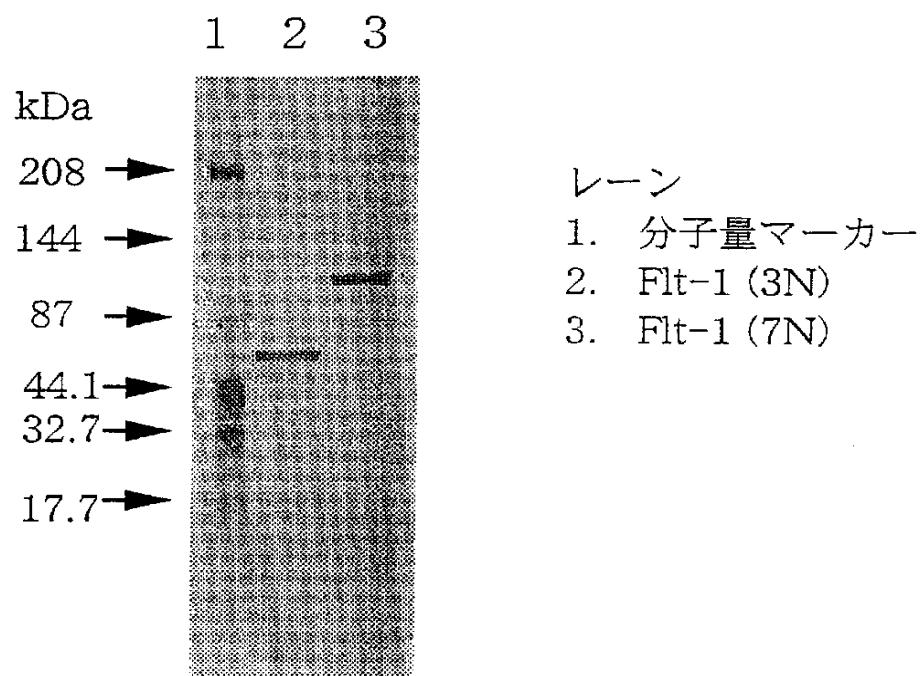
## 第 19 図



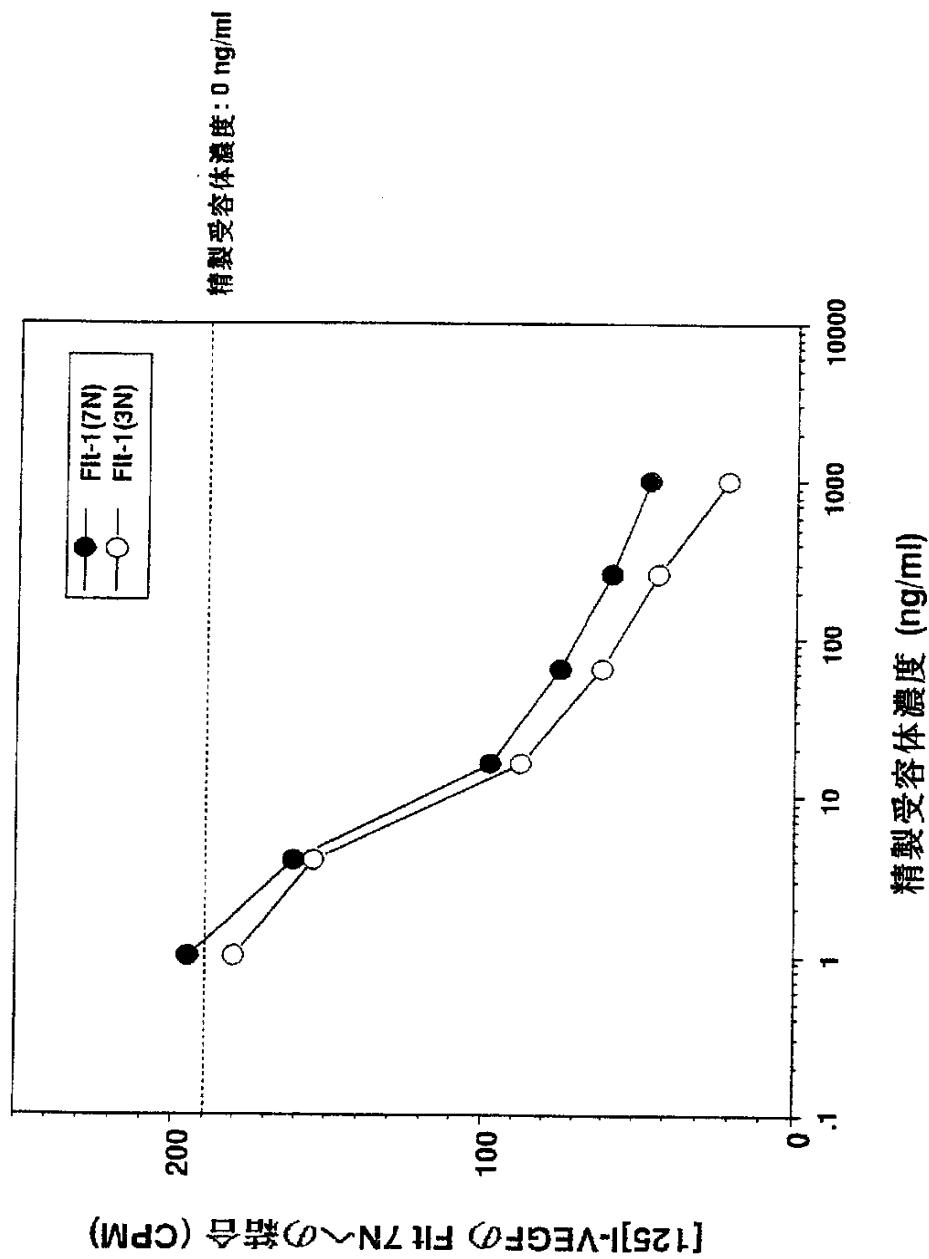
## 第 20 図



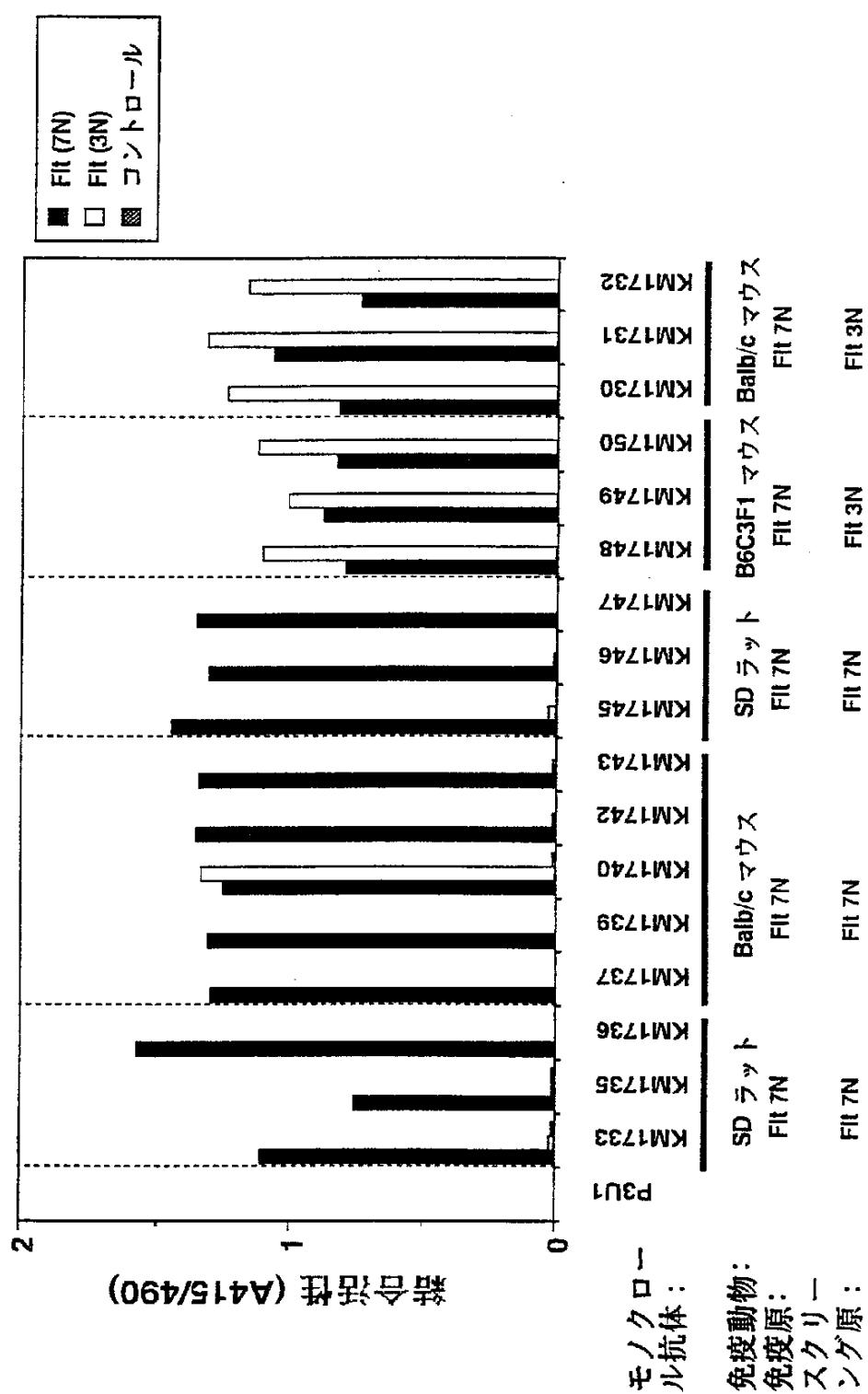
## 第 21 図



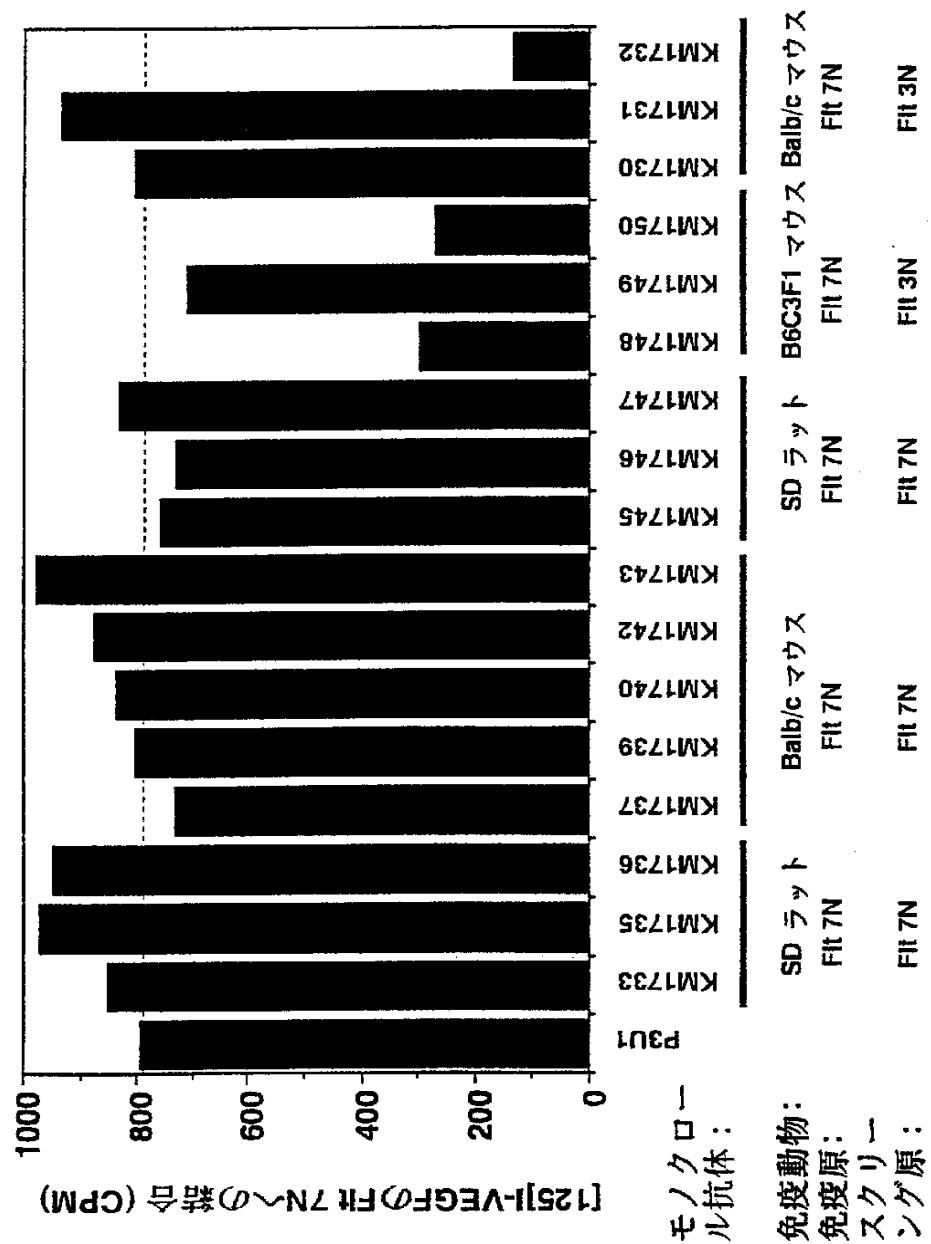
第 22 図



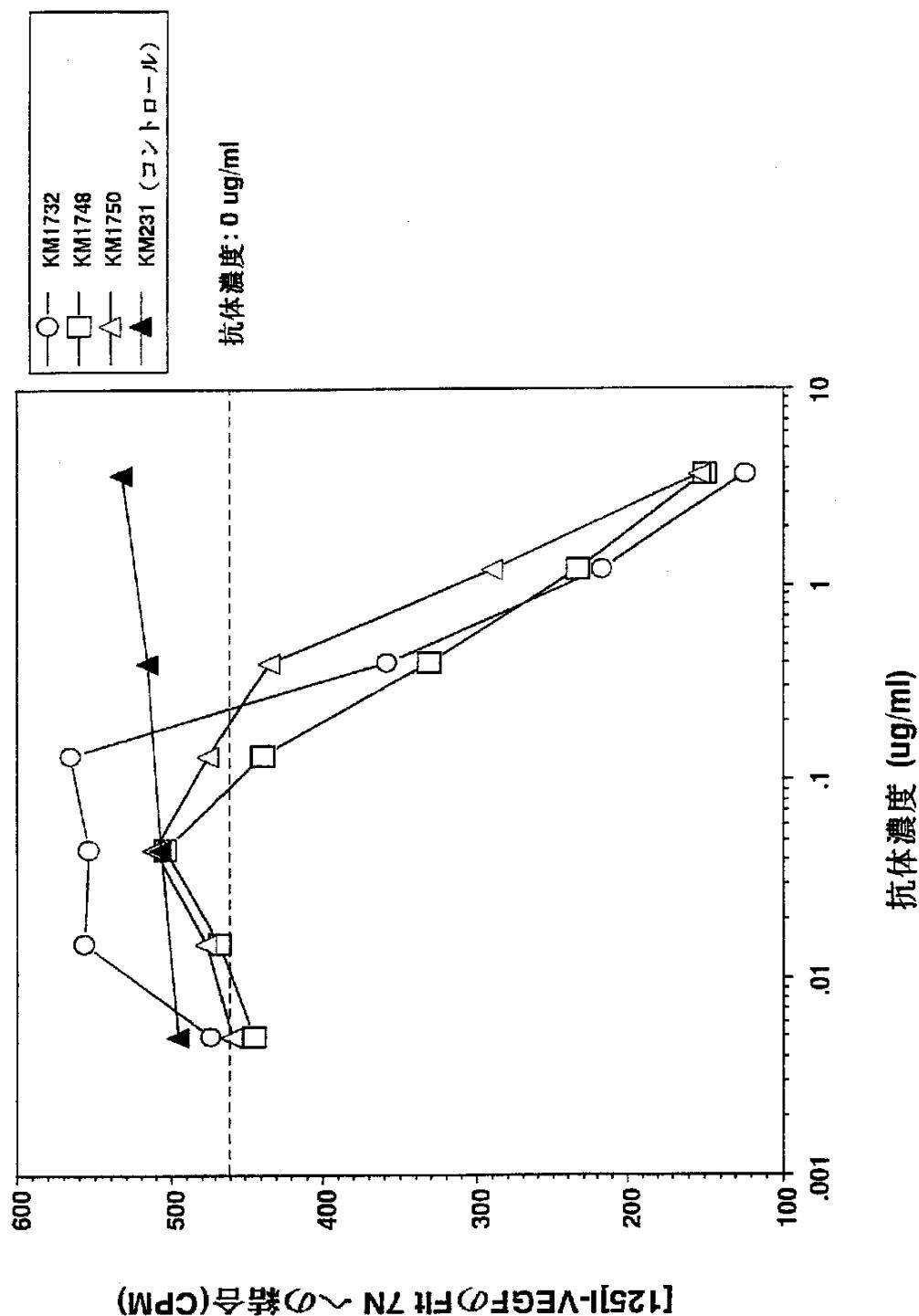
第 23 図



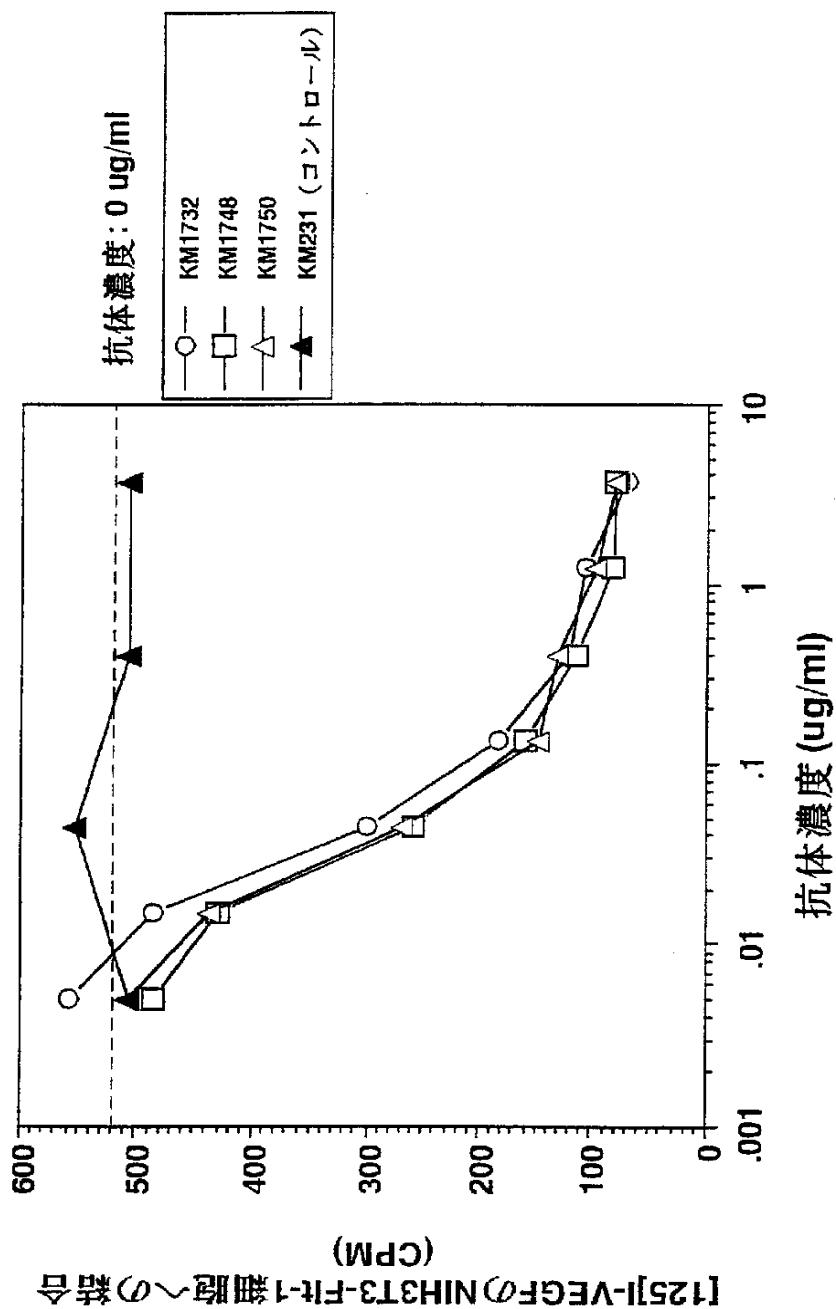
第 24 図



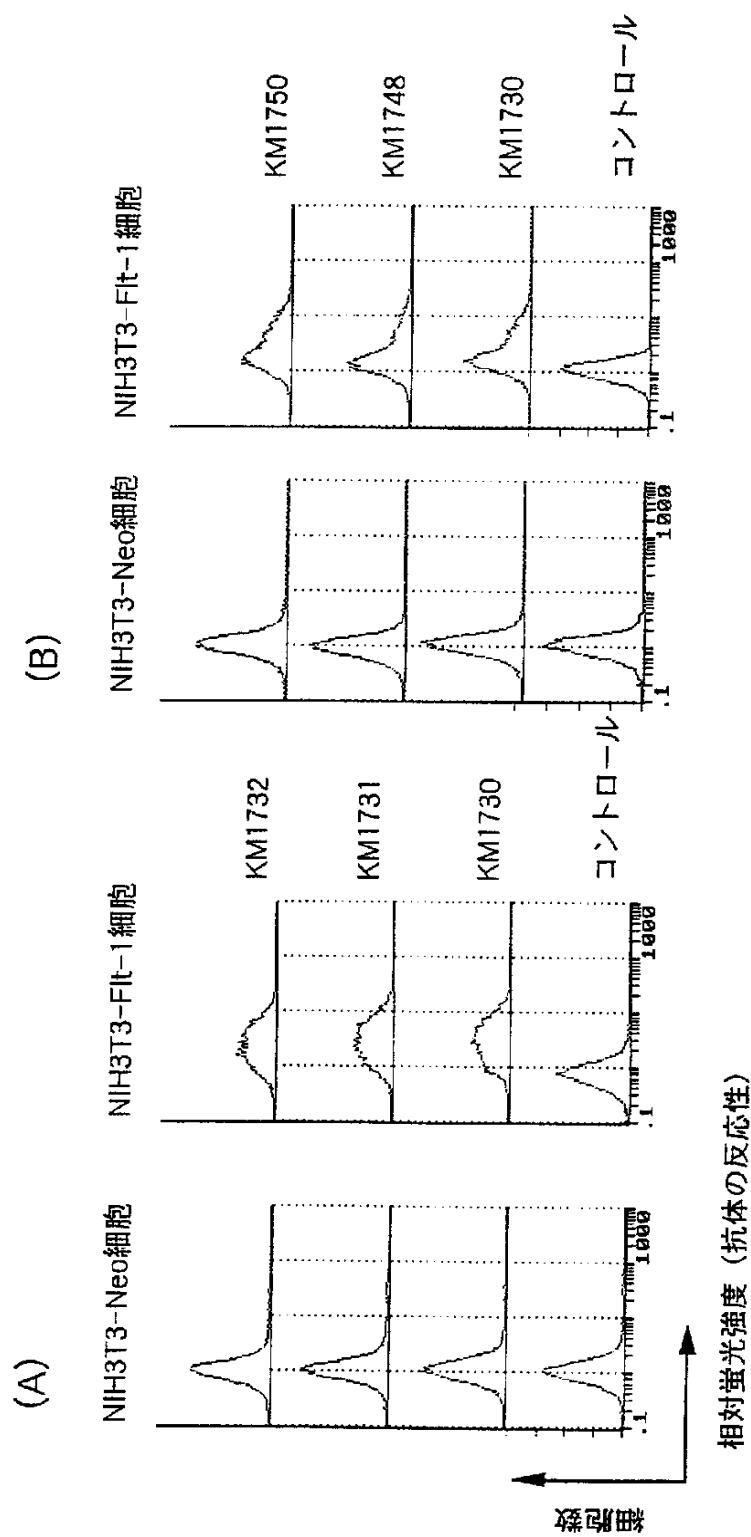
第 25 図



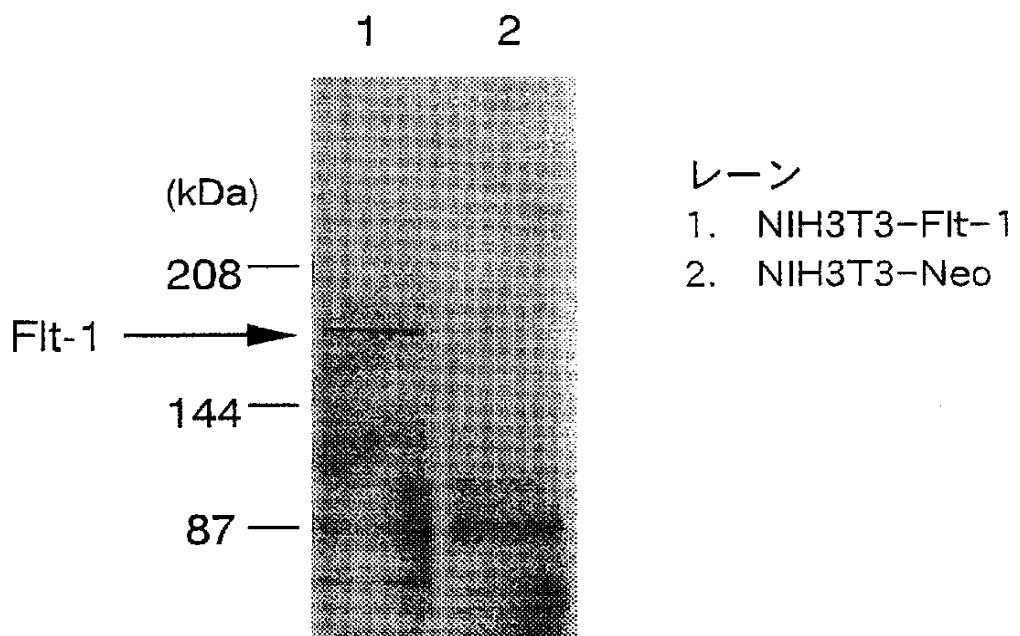
第 26 図



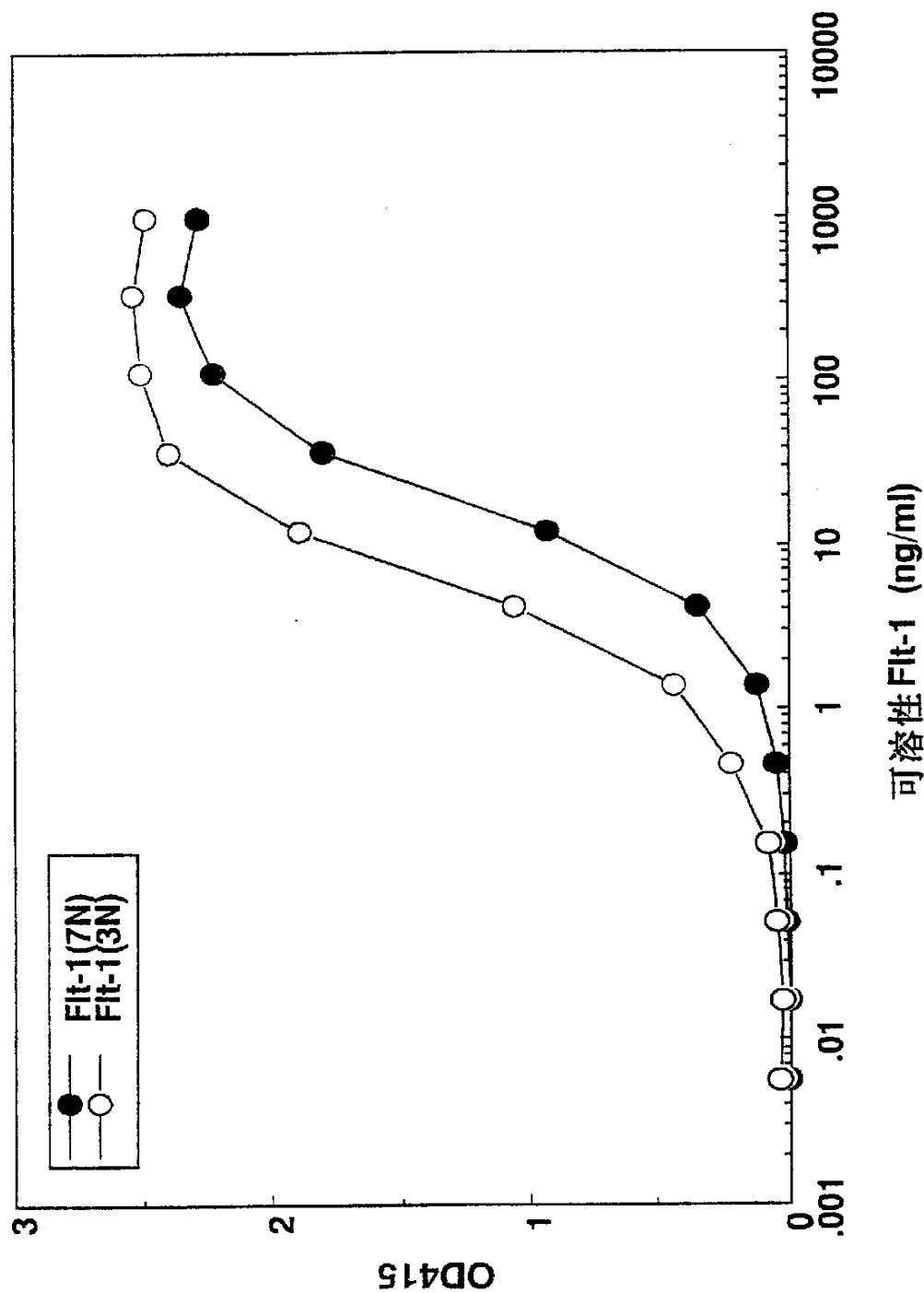
第 27 図



## 第 28 図

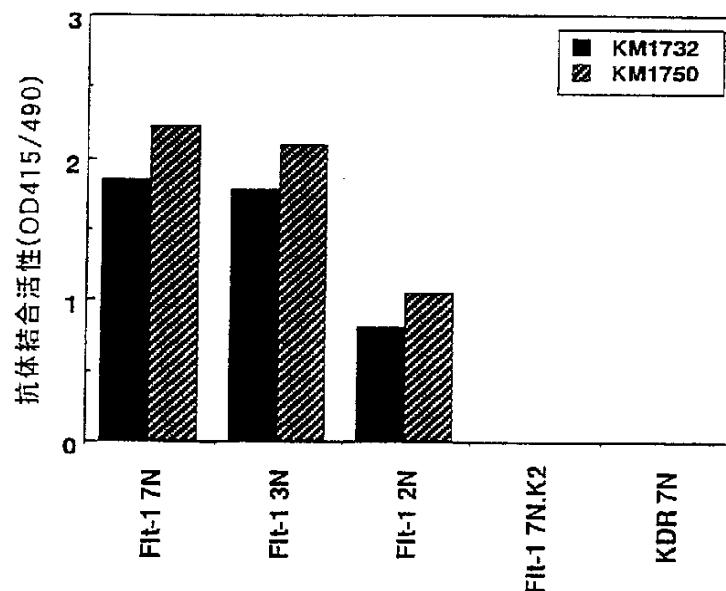


第 29 図

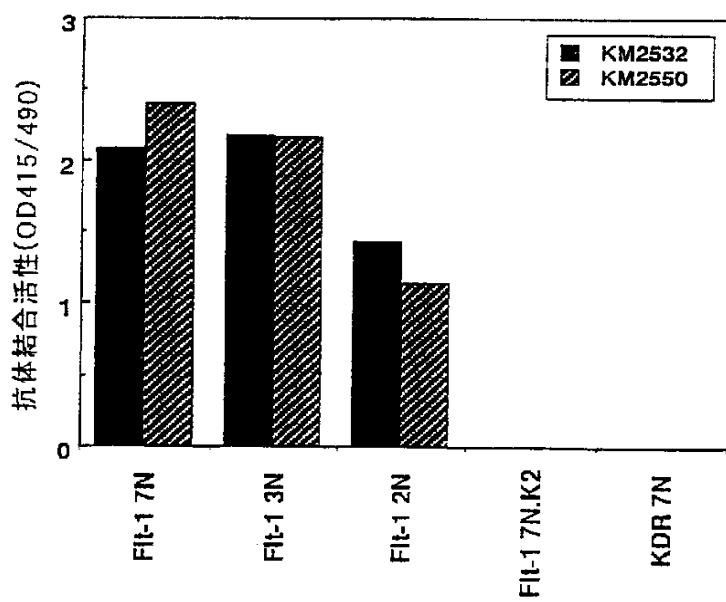


## 第 30 図

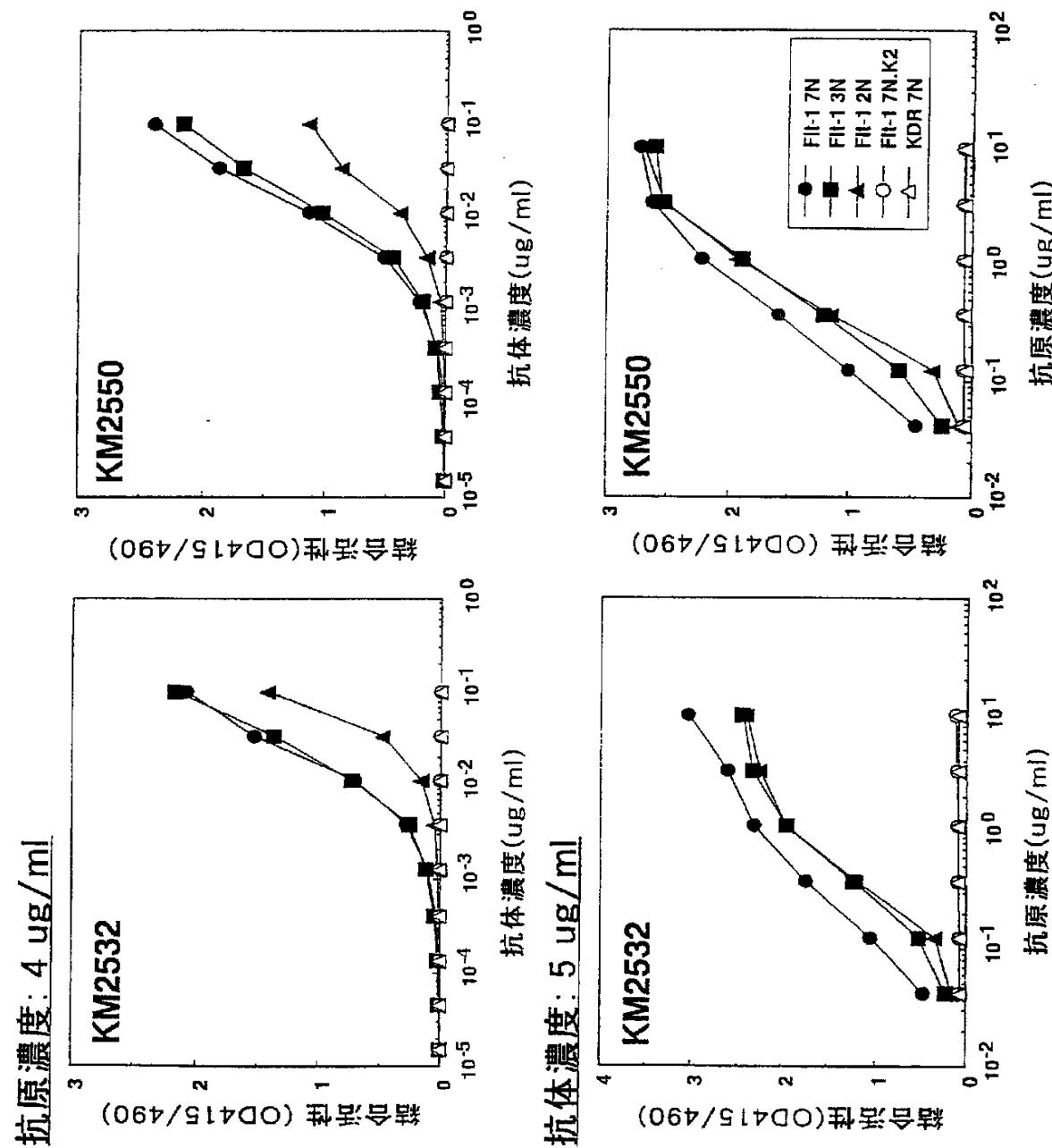
## マウスモノクローナル抗体



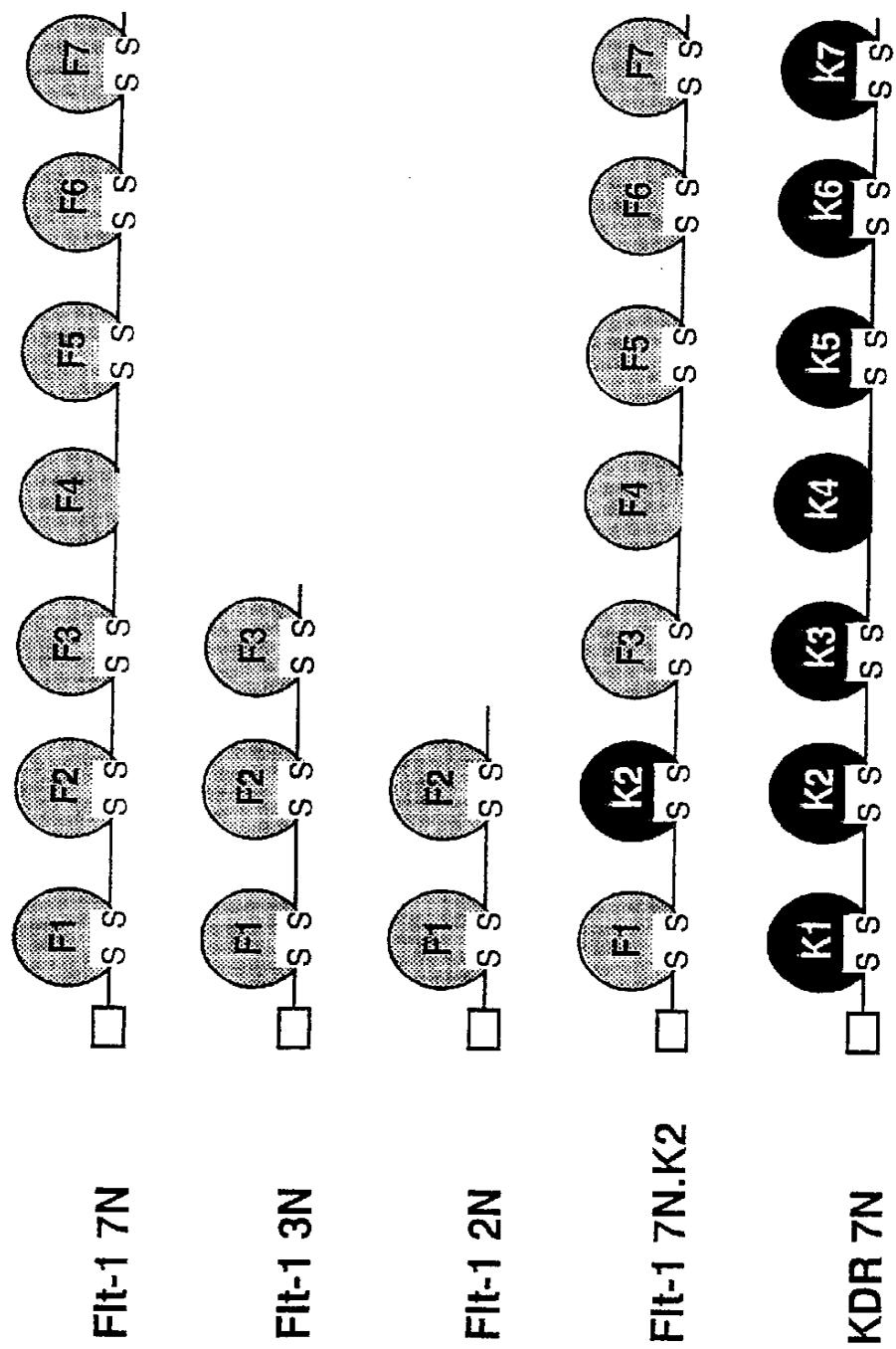
## キメラ抗体



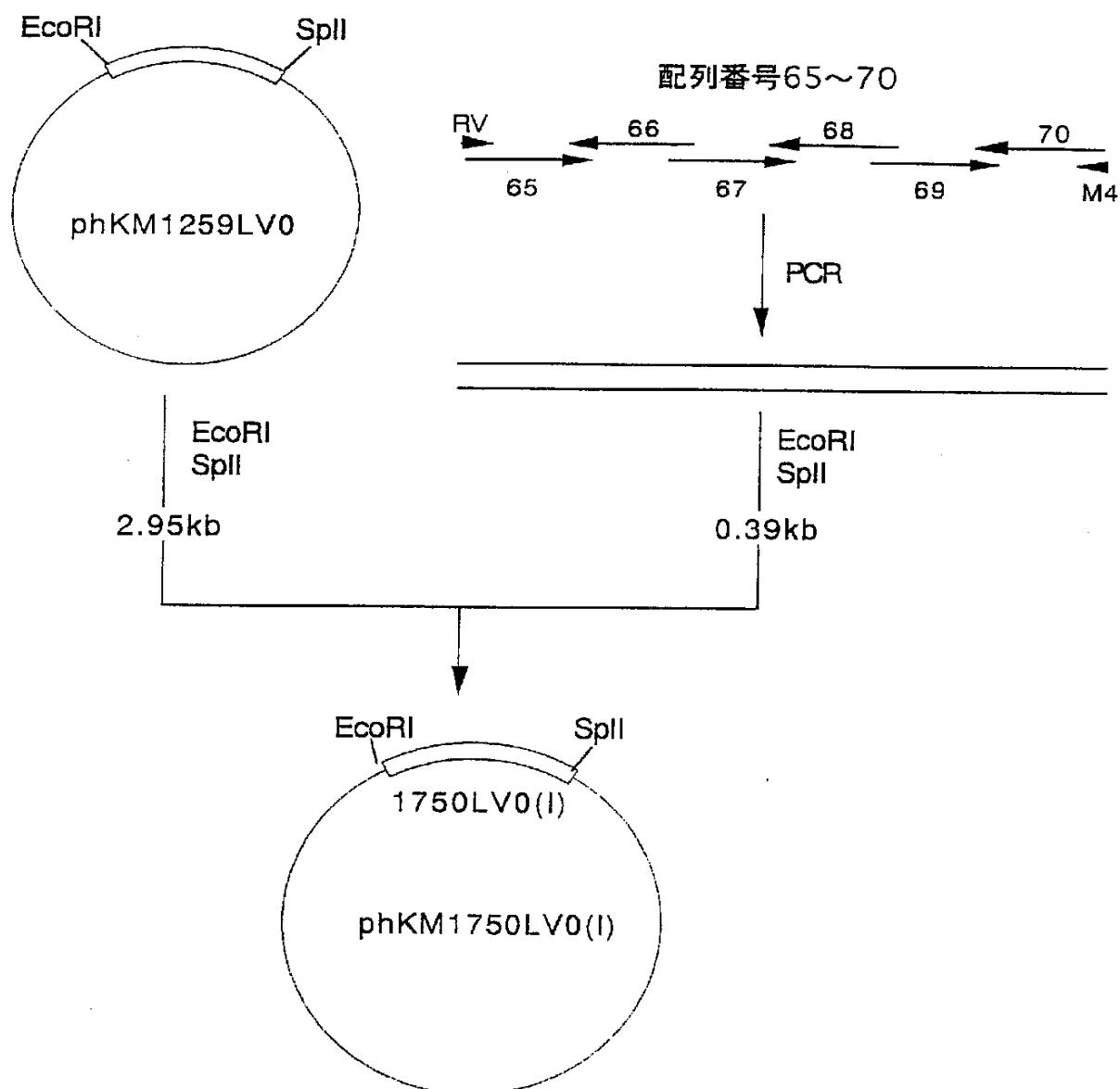
第 31 図



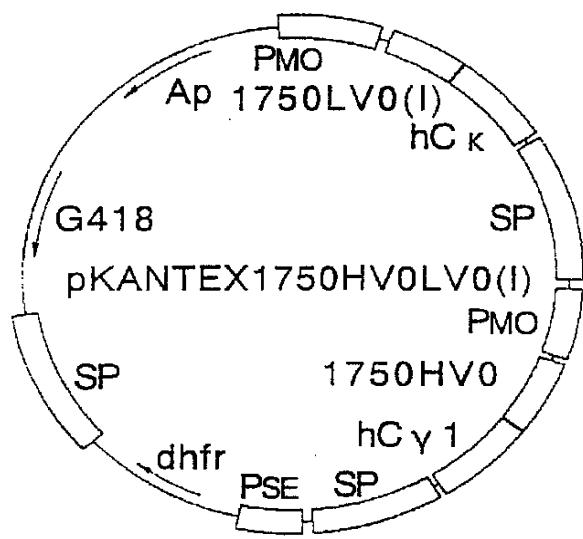
第 32 図



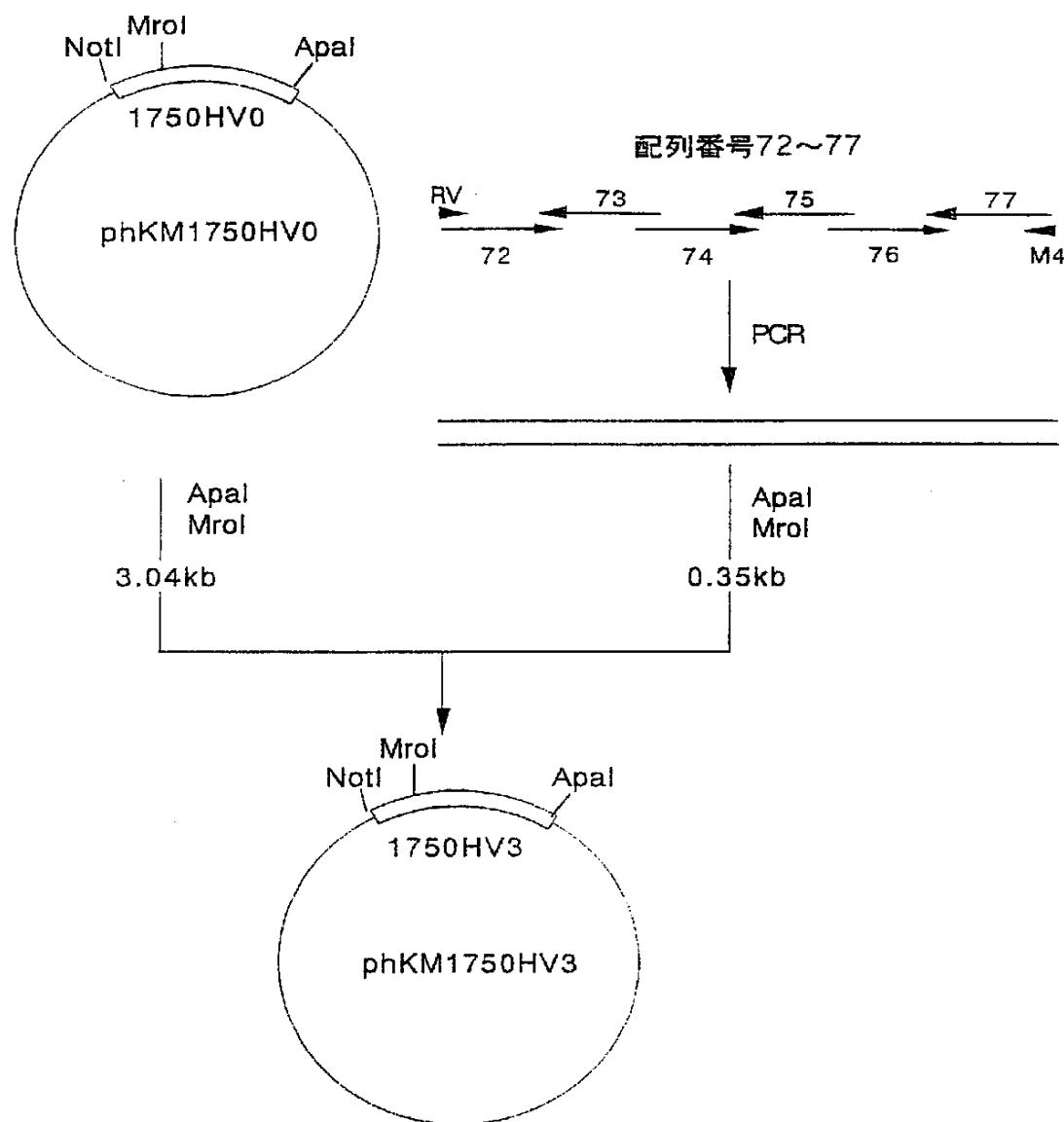
## 第 33 図



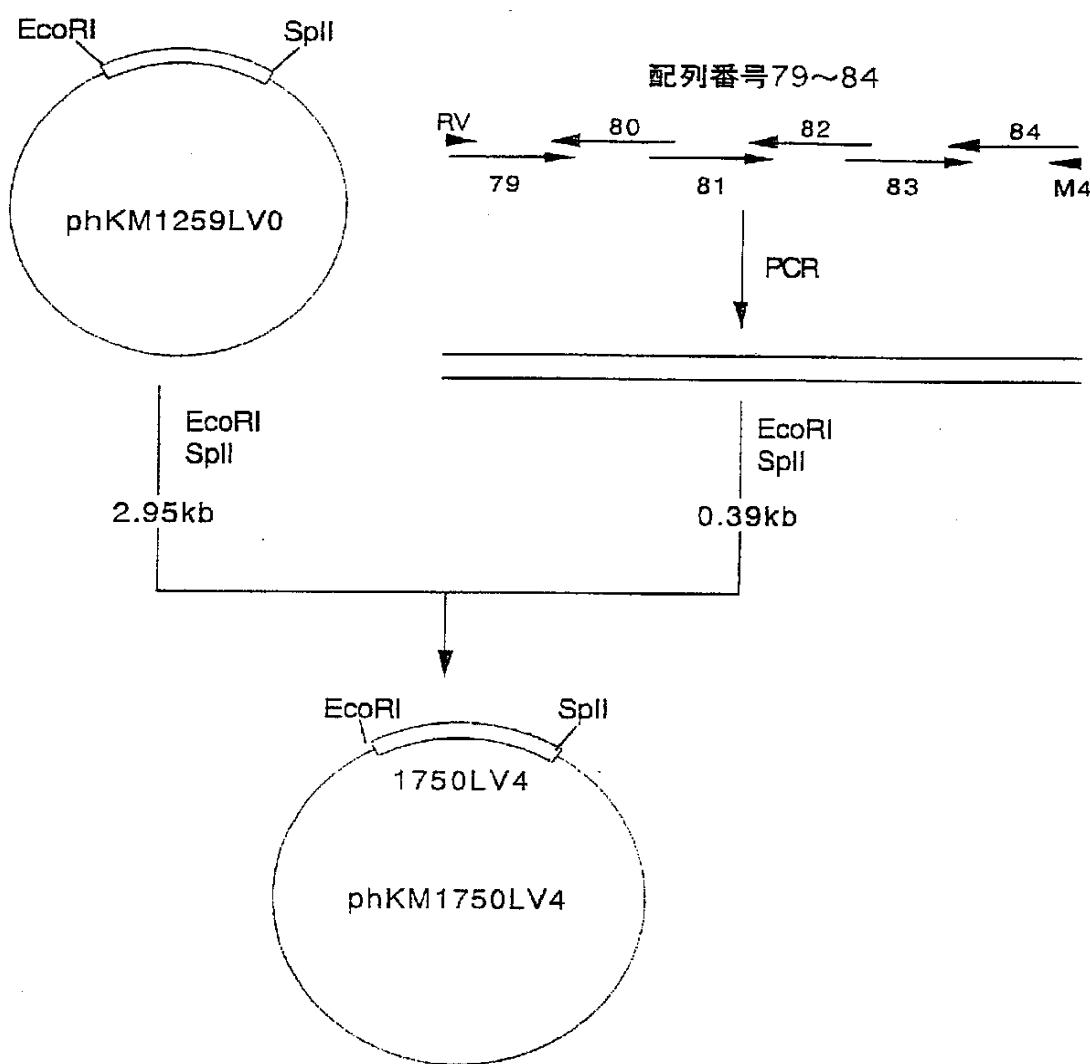
## 第 34 図



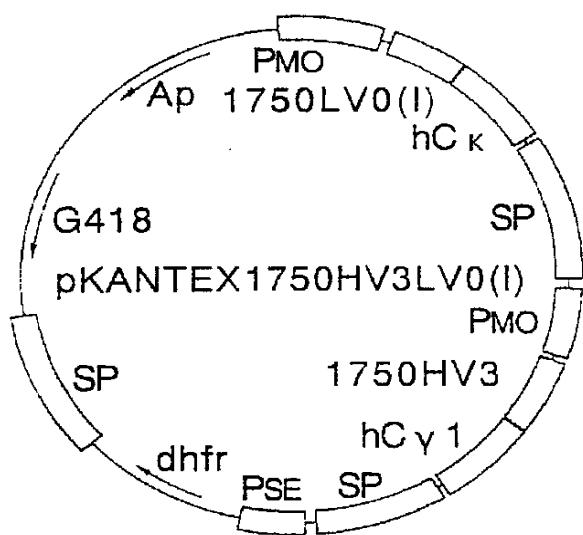
## 第 35 図



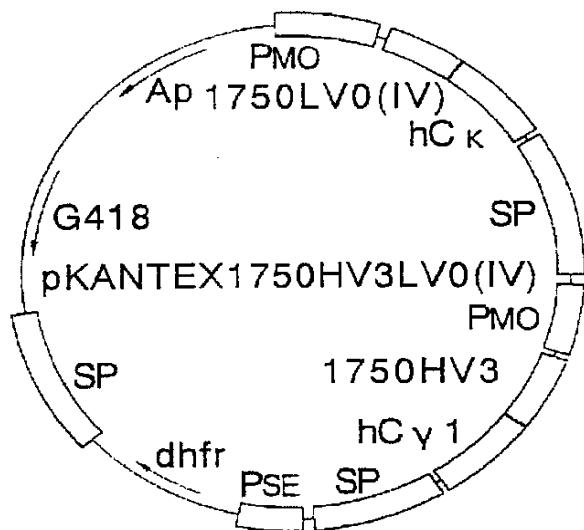
## 第 36 図



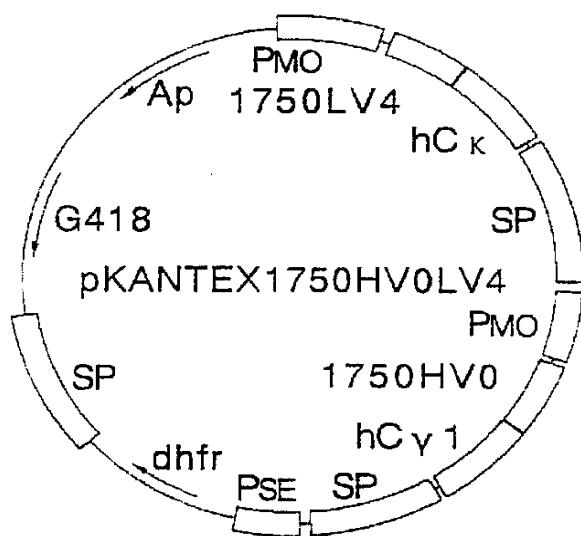
## 第 37 図



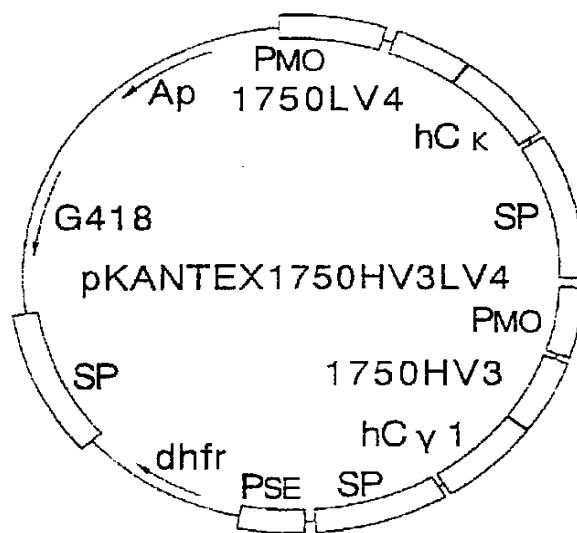
## 第 38 図



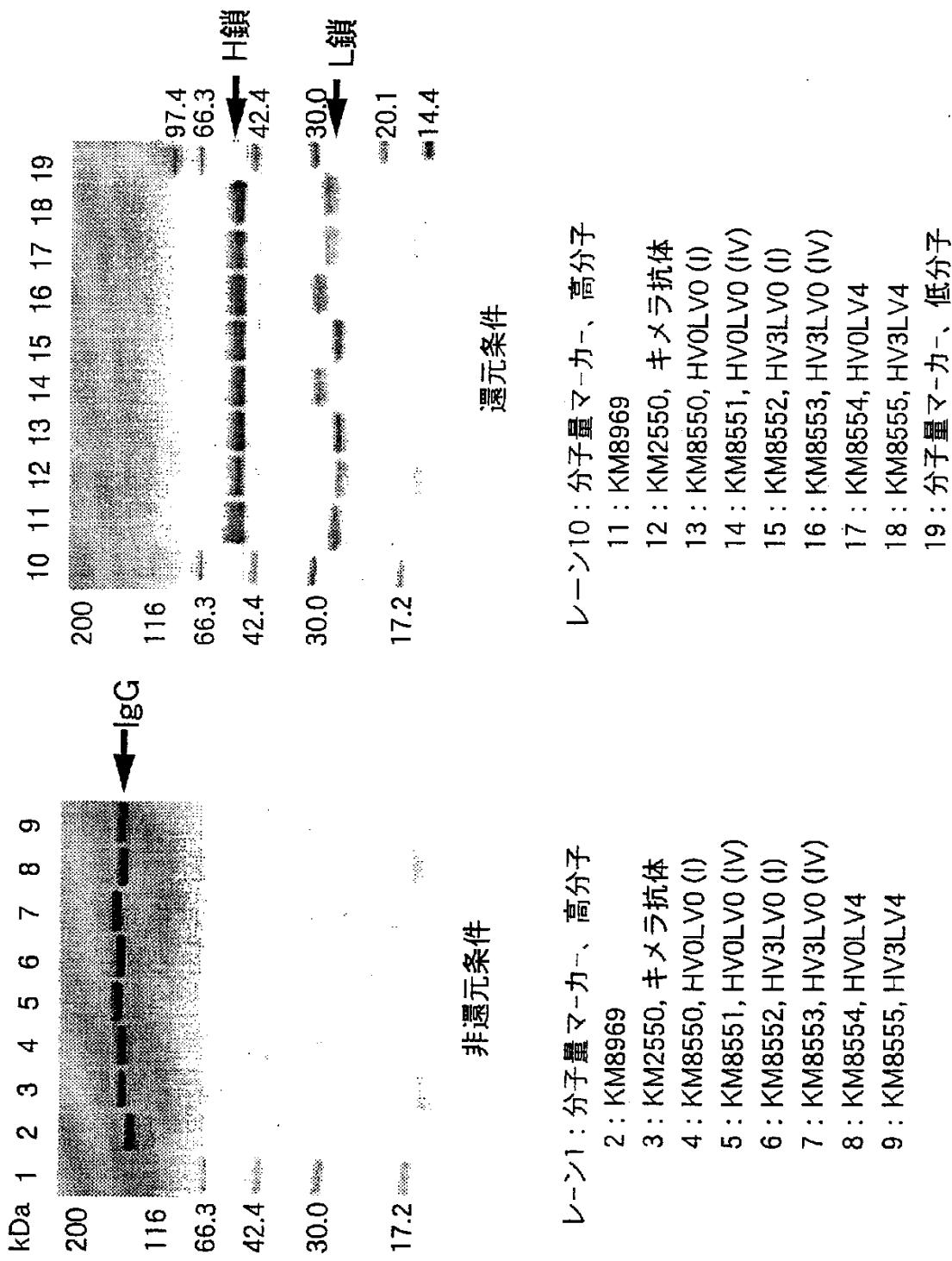
## 第 39 図



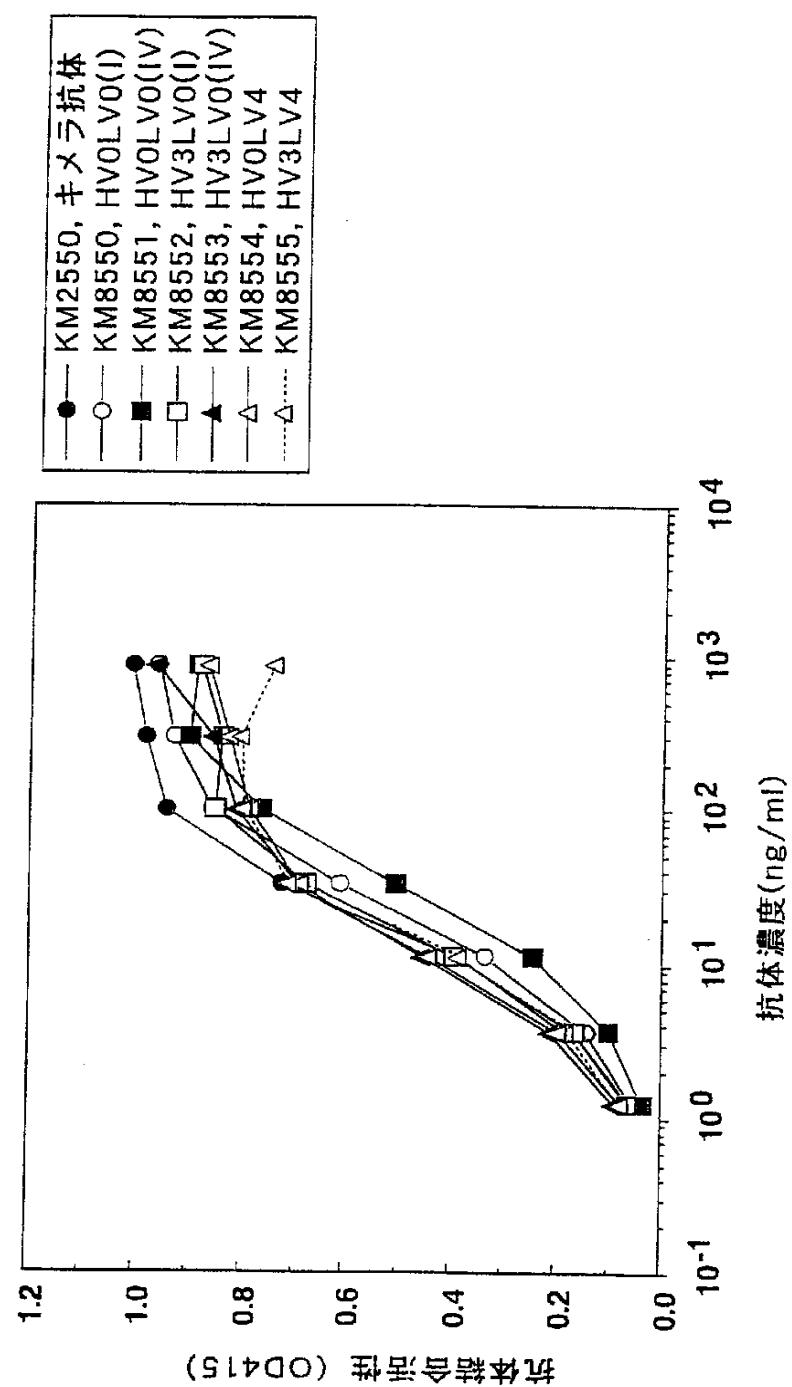
## 第 40 図



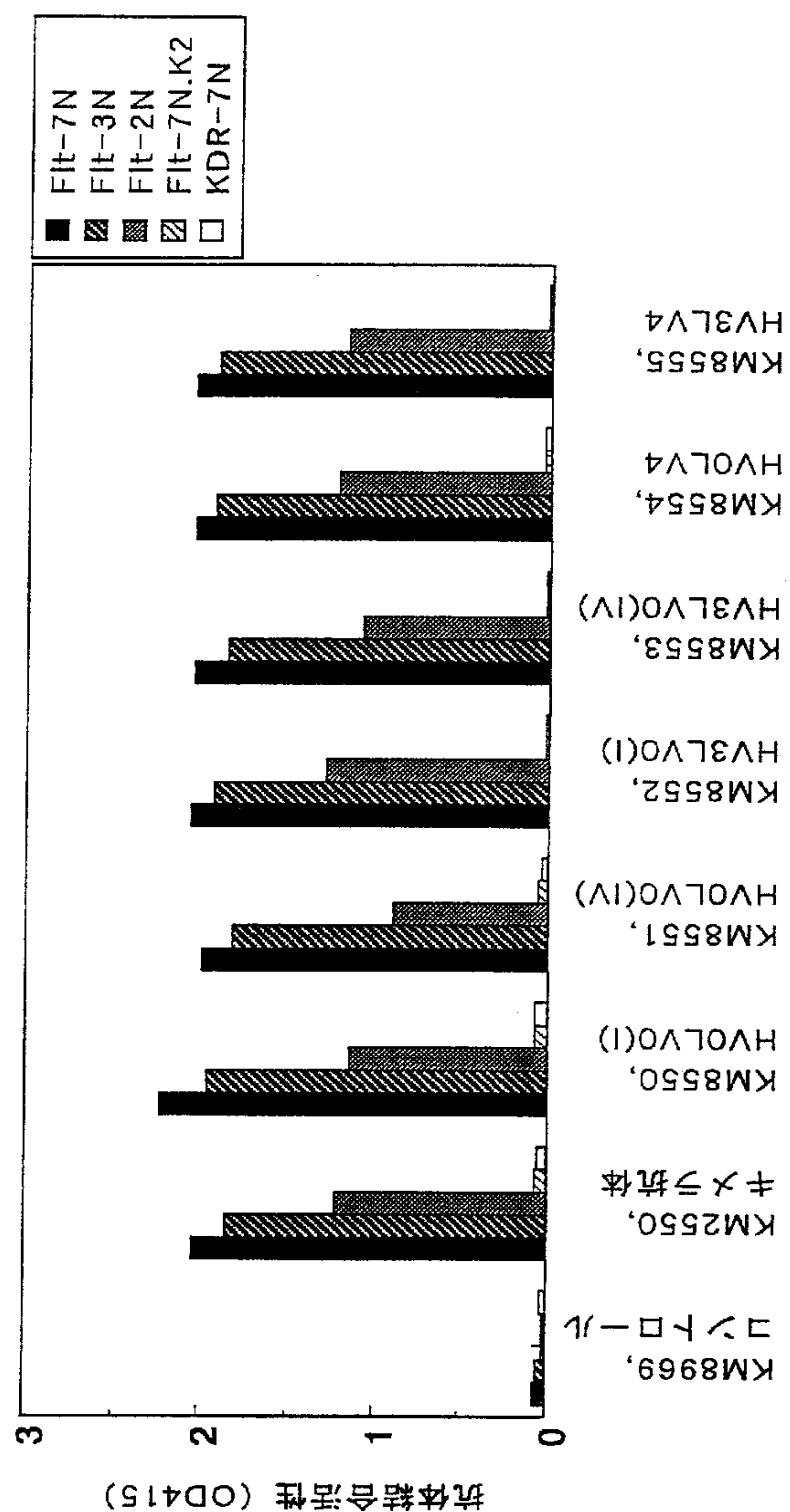
## 第 41 図



第 42 図

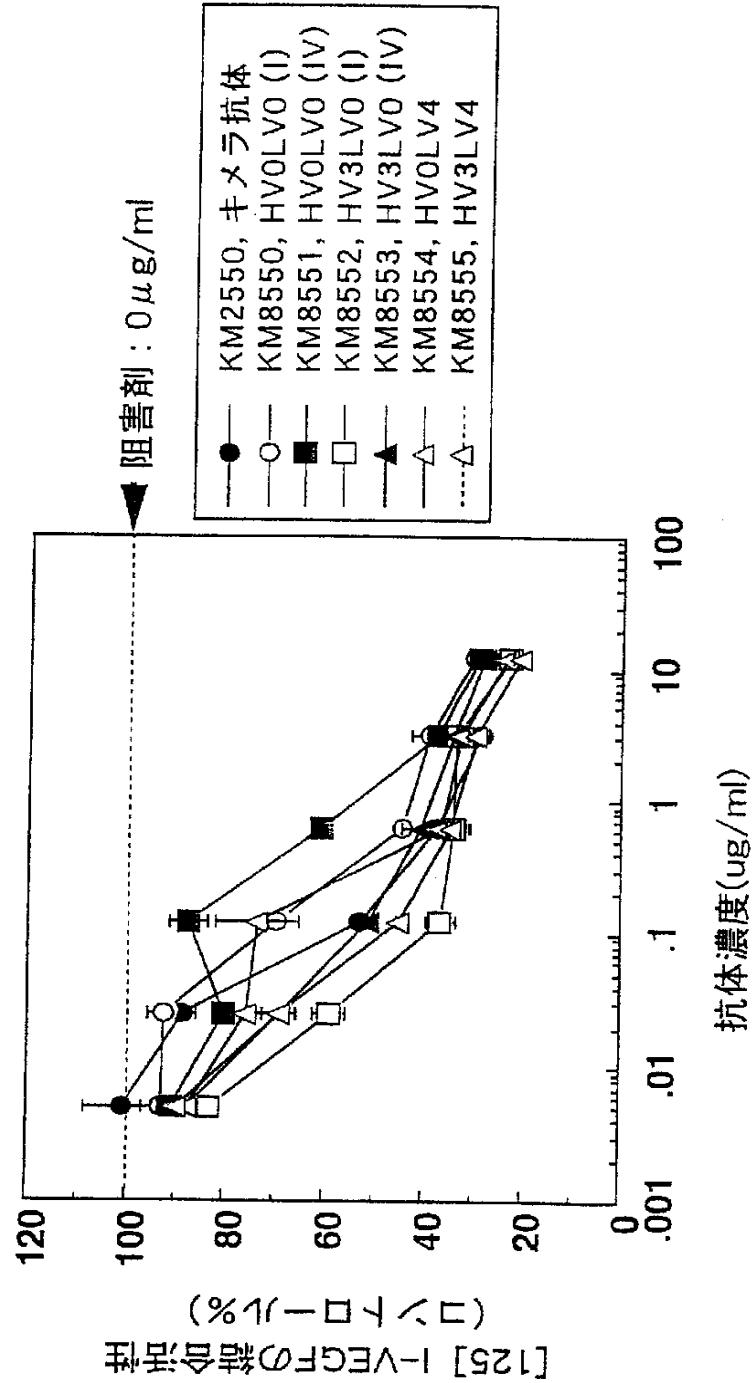


第 43 図



第 44 図

## VEGF-可溶性Flt-1結合実験系



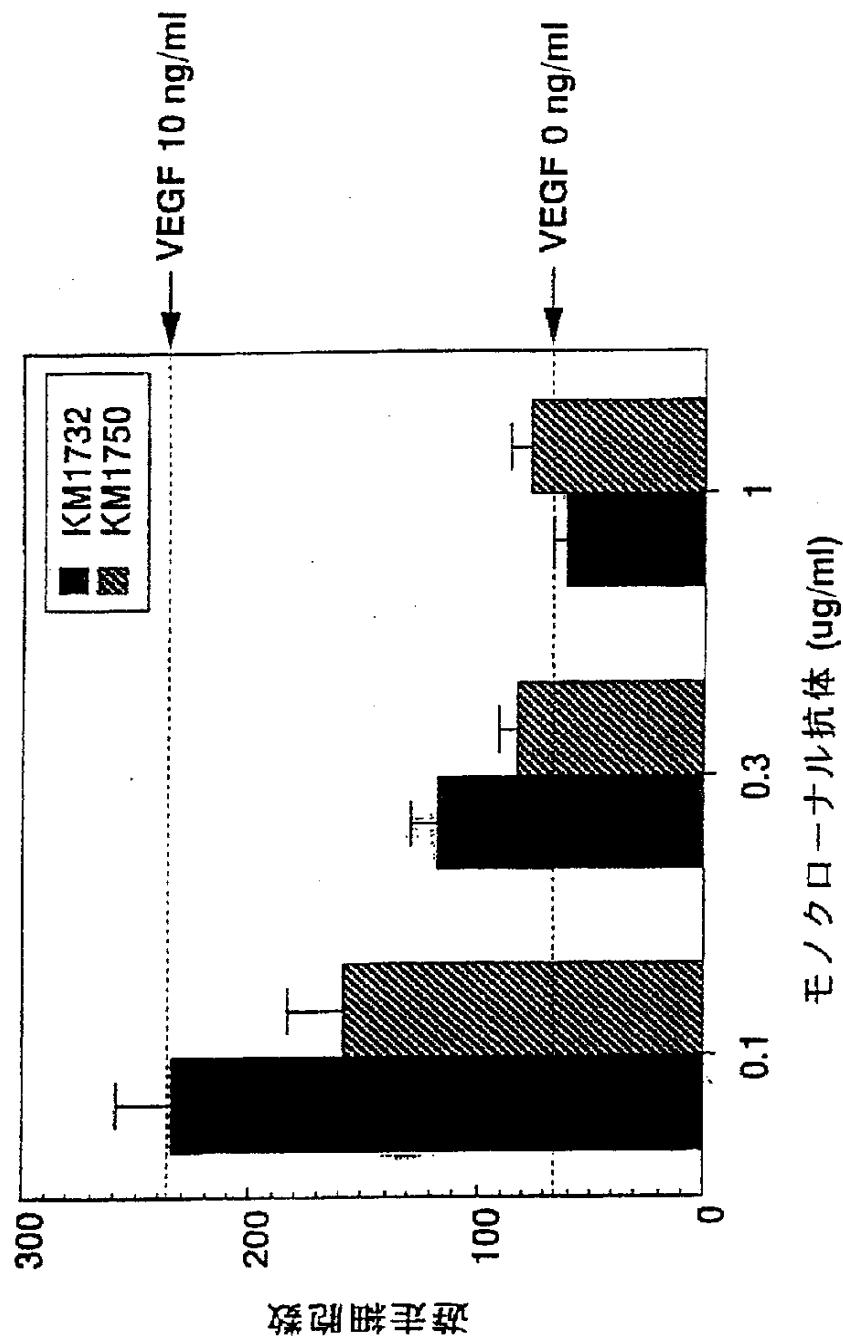
### 第 45 図

## 第 46 図

L鎖

		FR1	FR2	CDR1	FR2	CDR2	FR3
1750	mouse	1	QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTC	SASSSVSYMH	WYQQKSGTSPKLLIY	RTSNLAS	GVPF
1750	LV0(I)	1	DIQMTQSPSSLSAVGDRVITC	SASSSVSYMH	WYQQKPGKAPKLLIY	RTSNLAS	GVPSR
1750	LV4	1	DIQMTQSPSSLSAVGEEVITC	SASSSVSYMH	WYQQKPGKAPKLLIY	RTSNLAS	GVPSR
			1718				60
				CDR3	FR4		
61	FSGSGSGTFSLTISSEVAEDAADYYC	HQWSMYT	FGGGTKLEIKR				
61	FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	HQWSMYT	FGQGTTKVEIKR	105			
61	FSGSGSGTFSYTTLTISLQPEDFATYYC	HQWSMYT	FGQGTTKVEIKR	105			
			6970				60
				CDR3	FR2		
				CDR1	FR2		
1750	mouse	1	QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTC	SASSSVSYMH	WYQQKSGTSPKLLIY	RTSNLAS	GVPF
1750	LV0(IV)	1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	SASSSVSYMH	WYQQKPGQPPKLLIY	RTSNLAS	GVPSR
				CDR3	FR4		
61	FSGSGSGTFSLTISSEVAEDAADYYC	HQWSMYT	FGGGTKLEIKR				
61	FSGSGSGTDFTLTISLQADEDVAVYYC	HQWSMYT	FGQGTTKVEIKR	105			

第 47 図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Recombinant antibody

<130> 11141WO

<140>

<141>

<150> H10-139000

<151> 1998-05-20

<160> 96

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 415

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(414)

<400> 1

atg gaa tgg aac tgg gtc gtt ctc ttc ctc ctg tca tta act gca ggt 48

Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly

-19

-15

-10

-5

gtc tat gcc cag ggt cag atg cag cag tct gga gct gag ctg gtg aag 96

Val Tyr Ala Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys

-1 1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag cct tct ggc ttc acc ttc 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Pro Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

agt agt aac tat ata agt tgg ttg aag cag aag cct gga cag agt ctt 192  
Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu

30 35 40 45

gag tgg att gct tgg att tat gct gga act ggt gat gcc agc tat aat 240  
Glu Trp Ile Ala Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn

50 55 60

cag aag ttc aca gcc aag gcc cac gtg act gta gac aca tcc tcc agc 288  
Gln Lys Phe Thr Ala Lys Ala His Val Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser

65 70 75

aca gcc tac atg cag ttg agt agc ctg aca act gag gac tct gcc atc 336  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile

80 85 90

tat tac tgt gca cga cac ggg ggg gac ggc tac tgg ttt gct tac tgg 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp

95 100 105

ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca g 415  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110 115 119

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 385

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 2

atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 gtc ata ata tcc aga gga caa ctt gtt ctc acc cag tct cca gca atc 96  
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 -5 -1 1 5 10  
 atg tct gca tct caa ggg gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc 144  
 Met Ser Ala Ser Gln Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25  
 tca agt gtc agt tac atg cac tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc 192  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 30 35 40  
 ccc aaa aga tgg att tat gac aca tcc aaa ctg cct tct ggt gtc cct 240  
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc 288  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 60 65 70  
 agc agc atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tat tgc cag cag tgg 336  
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 75 80 85 90  
 agt agt aac cca ccc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gaa ctg aaa 384  
 Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 95 100 105 106

<210> 3

<211> 409

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(408)

<400> 3

atg gga ttc agc agg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtg act aca ggt 48

Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly

-19 -15 -10 -5

gtc cac tcc cag gct ttt cta cag cag tct ggg gct gag ctg gtg agg 96

Val His Ser Gln Ala Phe Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

-1 1 5 10

cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

atc aat tac aat atg cac tgg gta aag cag aca cct aga cag ggc ctg 192

Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu

30 35 40 45

gaa tgg att gga gct att ttt cca gga aat ggt ttt act tcc tac aat 240

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn

50 55 60

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc 288

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

65 70 75

aca gtc tac atg cag ctc cgc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc 336  
 Thr Val Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 80 85 90  
 tat ttc tgt gca aga gat ggt gac tat tac ttt gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105  
 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g 409  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 110 115 117

<210> 4  
 <211> 379  
 <212> DNA  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(378)

<400> 4  
 atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc 96  
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 -5 -1 1 5 10  
 atg tct gca tct cta ggg gag gag atc acc cta acc tgc agt gcc agc 144  
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25

tcg agt gta agt tac atg cac tgg tac cag cag aag tca ggc act tct 192  
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
30 35 40  
ccc aaa ctc ttg att tat aga aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct 240  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
45 50 55  
ttt cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc ttt tat tct ctc aca atc 288  
Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile  
60 65 70  
agc agt gtg gag gct gaa gat gct gcc gat tat tac tgc cat cag tgg 336  
Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
75 80 85 90  
agt atg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 379  
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
95 100 104

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 5

Ser Asn Tyr Ile Ser

1

5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 6

Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Thr

1

5

10

15

Ala

17

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 7

His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 8

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 9

Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser

1

5

7

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 10

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

1 5 9

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223>

<400> 11

Asn Tyr Asn Met His

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223>

<400> 12

Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

17

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 13

Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 8

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 14

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 15

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5 7

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 16

His Gln Trp Ser Met Tyr Thr

1 5 7

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 17

gccaagggac tctggtcact gtctctgcag cctccaccaa gggcc

45

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

cttgggtggag gctgcagaga cagtgaccag agtcccttgg c

41

<210> 19

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

cttattattg ccagcagttgg agtagtaacc caccacgtt cggtgctggg accaagctgg 60  
aactgaaac

69

<210> 20

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 20

gtacgtttca gttccagcgtt ggtcccagca ccgaacgtgg gtgggttact actccactgc 60  
tggcaataat aagt 74

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 21

tcagcctcca ccaagggcc 19

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 22

cttgggtggag g 11

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

cgttcgagg ggggaccaag ctggaaataa aac

33

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

gtacgttta ttccagctt ggtcccccct ccgaa

35

<210> 25

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

cagggaaacag ctatgacgct gccgccacca tggaatggaa ctgggtcgtt ctcttcctcc 60  
tgtcattAAC tgcaggtgtc tatgcccagg tgca 94

<210> 26

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

gtgttatccag aagccttgca ggagaccttc actgaggcgc caggcttctt cacctcagcc 60  
ccagactgca ccagctgcac ctgggcatag acacc 95

<210> 27

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

tgcaaggctt ctggatacac cttagcagt aactatataa gttgggtgcg acaggcccct 60  
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatt tatg 94

<210> 28

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

aggctgtgct cgtggatgtg tcgacggtaa tggtgactct ggctgtgaac ttctgattat 60  
agctggcattc accagttcca gcataaatcc atcccatcca c 101

<210> 29

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

cacatccacg agcacagcct acatggagct gagcagccctg agatctgagg acacggccgt 60  
gttattactgt gcgagacacg gggggacgg ctactggttt 100

<210> 30

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 30

gttttccccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60  
ggccccagta agcaaaccag tagccgtccc ccc 93

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 421

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(420)

&lt;400&gt; 31

atg gaa tgg aac tgg gtc gtt ctc ttc ctc ctg tca tta act gca ggt 48

Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly

-19 -15 -10 -5

gtc tat gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96

Val Tyr Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

cct ggc gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

agc agt aac tat ata agt tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gag tgg atg gga tgg att tat gct gga act ggt gat gcc agc tat aat 240  
Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn  
50 55 60  
cag aag ttc aca gcc aga gtc acc att acc gtc gac aca tcc acg agc 288  
Gln Lys Phe Thr Ala Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser  
65 70 75  
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
tat tac tgt gcg aga cac ggg ggg gac ggc tac tgg ttt gct tac tgg 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp  
95 100 105  
ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca g 415  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

<210> 32

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

caggaaacag ctatgacgcg gcccacca tgggattcag caggatctt ctcttcctcc 60  
tgtcagtgac tacaggtgtc cactcccagg tgcagc 96

<210> 33

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

ggtgtatcca gaagccttgc aggagacctt cactgaggcc ccaggcttct tcacctcagc 60  
tccggactgc accagctgca cctgggagtg gaca 94

<210> 34

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

gcaaggcttc tggatacacc ttcattaatt acaatatgca ctgggtgcga caggcccctg 60  
gacaagggt tgagtggatg ggagctattt 90

<210> 35

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

tgtgctcgta gacttgtcga cggtaatggg gactctgccc ttgaacttct gattgttagga 60  
agtaaaaacca tttcctggaa aaatagctcc 90

<210> 36

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

tcgacaagtc cacgagcaca gcctacatgg agctgagcag cctgagatct gaggacacgg 60  
ccgtgttatta ctgtgcgaga gatggtgact attac 95

<210> 37

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

gttttcccaag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60  
ggccccagta gtcaaagtaa tagtcaccat ctctcg 96

<210> 38

<211> 409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(408)

<400> 38

atg gga ttc agc agg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtg act aca ggt 48  
Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
-19 -15 -10 -5  
gtc cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tcc gga gct gag gtg aag aag 96  
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
-1 1 5 10  
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
15 20 25  
att aat tac aat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
30 35 40 45  
gag tgg atg gga gct att ttt cca gga aat ggt ttt act tcc tac aat 240  
Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
50 55 60  
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc att acc gtc gac aag tcc acg agc 288  
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
65 70 75  
aca gcc tac atg gag ctg agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
tat tac tgt gcg aga gat ggt gac tat tac ttt gac tac tgg ggc cag 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105  
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca g 409  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 117

<210> 39

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

cagggaaacag ctagacgaa ttccaccatg gatttcaag tgcagattt cagttcctg 60  
ctaatcagtg cctcagtcat aataatcc 87

<210> 40

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

aagtgtatggc gactctgtct cctacagatg cagacaggga ggatggagac tgggtcatct 60  
ggatatatctcc tctggatatt atgactgagg cac 93

<210> 41

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 41

agacagagtc accatcactt gtagtgctag ctcaagtgtc agttacatgc actggtatca 60  
gcagaaaacca gggaaagccc ctaag 85

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 42

atccactgcc gctgaacctt gatgggaccc cagaaggcag tttggatgtg tcatacatca 60  
gaagcttagg ggcttcctt ggtt 84

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 94

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 43

aaggttcagc ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gcctgcagcc 60  
tgaagattt gcaacttatt actgtcagca gtgg 94

<210> 44

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

gttttccca gtcacgaccgt acgtttgate tctacaccttgg tcccttggcc gaacgtgggt 60  
gggttactac tccactgctg acagtaataa g 91

<210> 45

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 45

atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

-22 -20

-15

-10

gtc ata ata tcc aga gga gat atc cag atg acc cag cag tct cca tcc tcc 96  
Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
-5 -1 1 5 10

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gct agc 144  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
15 20 25

tca agt gtc agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc 192  
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
30 35 40

cct aag ctt ctg atc tat gac aca tcc aaa ctg cct tct ggg gtc cca 240  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro  
45 50 55

tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 288  
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
60 65 70

agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag tgg 336  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
75 80 85 90

agt agt aac cca ccc acg ttc ggc caa ggg acc aag gta gag atc aaa 384  
Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
95 100 105 106

c 385

<210> 46

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46

caggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg gatttcagg tgcagattt cagttcctg 60  
ctaatcagtg cctcagtc aatg 84

<210> 47

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47

agttgatgtt ggccctctcg cccagagaca cagccaggaa gtctggagac tgggtcatca 60  
cgatgtctcc tctggacatt atgactgagg cactga 96

<210> 48

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 48

cgagagggcc accatcaact gcagtgccag ctcgagtgtt agttacatgc actggta 60  
gcagaaacca ggacagcctc ctaag 85

<210> 49

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

cagaccgcgt gccactgaat cggtcaggga ccccagaagc caggttggat gttctgtaaa 60  
tgagcagctt aggaggctgt cctggtt 87

<210> 50

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc atcagcagcc tgcaggctga 60  
agacgtcgca gtttattact gtcatc 86

<210> 51

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 51

gttttcccaag tcacgaccgt acgtttgatc tccacacctgg tcccttggcc gaacgtgtac 60  
atactccact gatgacagta ataaactgcg 90

<210> 52

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

<400> 52

atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
-22 -20 -15 -10

gtc ata atg tcc aga gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc 96  
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser  
-5 -1 1 5 10

ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc agt gcc agc 144  
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Ala Ser  
15 20 25

tcg agt gta agt tac atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct 192  
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
30 35 40

cct aag ctg ctc att tac aga aca tcc aac ctg gct tct ggg gtc cct 240  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
45 50 55

gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 288  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
60 65 70

agc agc ctg cag gct gaa gac gtc gca gtt tat tac tgt cat cag tgg 336  
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp

75	80	85	90	
agt atg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa c				379
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
95	100	104		

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53

cgacacaacca atataatcta agc 23

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

ggccgccttag attatattgg ttgt 25

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55

ggaatctaca ttgtcatagc t

21

<210> 56

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

ttatgcggcc gcttatacctt gaacagttag gta

33

<210> 57

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

ctcttagag

8

<210> 58

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

cagtgttctt ggctgtgcaa aaagtggagg cattttcat aatagaaggt gcctacgtag 60

<210> 59

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

gatcctacgt aggcaccttc tattatgaaa aatgcctcca cttttgcaca gccaaagaaca 60

ctgcatg

67

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60

GTATAATGAG CGGCCGCG

18

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61

gatccgcggc cgctcattat ac

22

<210> 62

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62

gaaggaaaca gaaggcgcca tctatatatt tattcgaggt accaatacaa tcata

56

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

aaactgactt ggccggcgcc atttatgtct 30

<210> 64

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

cataaaatcct ataggtacca acgacaacta 30

<210> 65

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 65

cagggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg gattttcaag tgcatgatgg cagttcctg 60  
ctaatcagtg cctcagtcat aatatcc 87

<210> 66

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66

aagtgtatggt gactctgtct cctacagatg cagacaggga ggatggagac tgggtcatct 60  
ggatatctcc tctggatatt atgactgagg cac 93

<210> 67

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 67

agacagagtc accatcaatt gtagtgcctag ctcgagtgtt agttacatgc actggatca 60  
gcagaaacca gggaaagccc ctaag 85

<210> 68

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

atccactgcc gctgaacctt gatgggaccc cagaagccag gttggatgtt ctatagatca 60  
gaagcttagg ggctttccct ggtt 84

<210> 69

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69

aaggttcagc ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gcctgcagcc 60  
tgaagatttt gcaacttatt actgtcatca gtgg 94

<210> 70

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 70

gttttcccag tcacgaccgt acgtttgate tctaccttgg tcccttggcc gaacgtgtac 60  
atactccact gatgacagta ataag 85

<210> 71

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

<400> 71

atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
-22 -20 -15 -10

gtc ata ata tcc aga gga gat atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc 96  
Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
-5 -1 1 5 10

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gcc agc 144  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
15 20 25

tcg agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc 192  
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
30 35 40

cct aag ctt ctg atc tat aga aca tcc aac ctg gct tct ggg gtc cca 240  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
45 50 55

tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 288  
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
60 35 70

agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tgg 336  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
75 80 85 90

agt atg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gta gag atc aaa c 379  
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
95 100 104

<210> 72

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 72

cagggaaacag ctatgactcc ggagctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggct 60  
cctgcaaggc ttctggatac 80

<210> 73

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 73

ccactcaagc cttgtccag gggcctgtcg cacccagtgc atattgtat taatgaagg 60  
gtatccagaa gccttgcagg 80

<210> 74

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 74

ctggacaaaagg gcttggatgg atgggagcta tttttccagg aaatggttt acttcctaca 60  
atcagaagtt caagggcaga g 81

<210> 75

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 75

tctcaggctg cgcagctgca tgtaggctgt gctcgtggac ttttcgacgg taatggtgac 60  
tctgcccttg aacttctga 79

<210> 76

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 76

tgcagctgcg cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgtt tttctgtgcg agagatgg 60  
actattactt tgactactgg ggc 83

<210> 77

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 77

gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60  
ggccccagta gtcaaagtaa t 81

<210> 78

<211> 409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(408)

<400> 78

atg gga ttc agc agg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtg act aca ggt 48  
Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
-19 -15 -10 -5

gtc cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tcc gga gct gag gtg aag aag 96  
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
-1 1 5 10

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
15 20 25

att aat tac aat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
30 35 40 45

gag tgg atg gga gct att ttt cca gga aat ggt ttt act tcc tac aat 240

Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
50 55 60  
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc att acc gtc gac aag tcc acg acg 288  
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
65 70 75  
aca gcc tac atg cag ctg cgc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
tat ttc tgt gcg aga gat ggt gac tat tac ttt gac tac tgg ggc cag 384  
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105  
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca g 409  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 117

<210> 79

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 79

cagggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg gattttcaag tgcagattt cagcttcctg 60  
ctaattcgtg cctcagtcat aatatcc 87

<210> 80

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 80

aagtgtatgg t gacccctct cctacagatg cagacaggga ggtatggagac tgggtcatct 60  
ggatatctcc tctggatatt atgactgagg cac 93

<210> 81

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 81

agaggaggtc accatcaatt gtagtgccag ctcgagtgt a agttacatgc actggtatca 60  
gcagaaaacca gggaaagccc ctaag 85

<210> 82

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 82

atccactgcc gctgaacatt gatgggaccc cagaaggccag gttggatgtt ctatagatca 60  
gaagctttagg ggcttccct ggtt 84

<210> 83

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 83

aaggttcagc ggcagtggat ctgggacatt ttatactctc accatcagca gcctgcagcc 60  
tgaagattt gcaacttatt actgtcatca gtgg 94

<210> 84

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 84

gttttcccaag tcacgaccgt acgtttgate tctaccttgg tcccttggcc gaacgtgtac 60  
atactccact gatgacagta ataag 85

<210> 85

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(378)

&lt;400&gt; 85

atg	gat	ttt	caa	gtg	cag	att	ttc	agc	ttc	ctg	cta	atc	agt	gcc	tca	48	
Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser		
-22	-20						-15						-10				
gtc	ata	ata	tcc	aga	gga	gat	atc	cag	atg	acc	cag	tct	cca	tcc	tcc	96	
Val	Ile	Ile	Ser	Arg	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser		
-5						-1	1			5					10		
ctg	tct	gca	tct	gta	gga	gag	gag	gtc	acc	atc	act	tgt	agt	gcc	agc	144	
Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser		
						15			20						25		
tcg	agt	gta	agt	tac	atg	cac	tgg	tat	cag	cag	aaa	cca	ggg	aaa	gcc	192	
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala		
					30			35					40				
cct	aag	ctt	ctg	atc	tat	aga	aca	tcc	aac	ctg	gct	tct	ggg	gtc	cca	240	
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro		
					45			50					55				
tca	agg	ttc	agc	ggc	agt	gga	tct	ggg	aca	ttt	tat	act	ctc	acc	atc	288	
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile
					60			65					70				
agc	agc	ctg	cag	cct	gaa	gat	ttt	gca	act	tat	tac	tgt	cat	cag	tgg	336	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Trp		
					75			80					85		90		
agt	atg	tac	acg	ttc	ggc	caa	ggg	acc	aag	gta	gag	atc	aaa	c		379	
Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
								95					100				

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 138

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mus musculus*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

<400> 86

Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly

-19 -15 -10 -5

Val Tyr Ala Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Pro Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu

30 35 40 45

Glu Trp Ile Ala Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn

50 55 60

Gln Lys Phe Thr Ala Lys Ala His Val Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser

65 70 75

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110 115 119

<210> 87

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223>

&lt;400&gt; 87

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
-22	-20						-15						-10		
Val	Ile	Ile	Ser	Arg	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
	-5			-1	1					5			10		
Met	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
		15						20					25		
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
		30						35				40			
Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Pro
		45					50					55			
Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
		60			65					70					
Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
		75			80				85				90		
Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
					95					100			105	106	

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 88

Met	Gly	Phe	Ser	Arg	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly
-19		-15						-10					-5		

Val His Ser Gln Ala Phe Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
15 20 25

Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu  
30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
50 55 60

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
65 70 75

Thr Val Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
80 85 90

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
110 115 117

<210> 89

<211> 126

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223>

<400> 89

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
-22 -20 -15 -10

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

-5	-1	1	5	10
Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser				
	15		20	25
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser				
	30		35	40
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro				
	45		50	55
Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile				
	60		65	70
Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp				
	75		80	85
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys				
	95		100	104

<210> 90

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 90

Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly				
-19	-15		-10	-5
Val Tyr Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys				
	-1	1	5	10
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe				
	15		20	25

Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
30 35 40 45  
Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn  
50 55 60  
CAG AAG TTC ACA GCC AGA GTC ACC ATT ACC GTC GAC ACA TCC ACG AGC 288  
Gln Lys Phe Thr Ala Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser  
65 70 75  
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp  
95 100 105  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 119

<210> 91

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 91

Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
-19 -15 -10 -5  
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
-1 1 5 10  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
15 20 25

Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
30 35 40 45  
Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
50 55 60  
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
65 70 75  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 117

<210> 92

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 92

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
-22 -20 -15 -10  
Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
-5 -1 1 5 10  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
15 20 25  
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
30 35 40  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro  
45 50 55

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 60 65 70

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 75 80 85 90

Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 105 106

<210> 93

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 93

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser  
 -5 -1 1 5 10

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
 30 35 40

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 45 50 55

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 60 65 70

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
 75 80 85 90

Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 104

<210> 94

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 94

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
-22	-20						-15						-10		
Val	Ile	Ile	Ser	Arg	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser
-5				-1	1				5				10		
Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
	15							20					25		
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala
	30							35				40			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	45						50					55			
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
	60					65						70			
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Trp
	75			80					85				90		
Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
	95								100				104		

<210> 95

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 95

Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
-19 -15 -10 -5  
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
-1 1 5 10  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
15 20 25  
Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
30 35 40 45  
Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
50 55 60  
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
65 70 75  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 117

<210> 96

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 96

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
-22 -20 -15 -10  
Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
-5 -1 1 5 10  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
15 20 25

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
30 35 40  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
45 50 55  
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile  
60 65 70  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
75 80 85 90  
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
95 100 104

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02661

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>6</sup> C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, C07K16/46, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, C07K16/46, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ, SwissProt/PIR/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 95/21868, A1 (IMCLONE SYSTEMS INC.), 17 August, 1995 (17. 08. 95) & AU, 9519147, A & EP, 741748, A1 & US, 5840301, A & US, 5874542, A	1-65, 67-68
Y	JP, 6-205694, A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 26 July, 1994 (26. 07. 94) & AU, 9346181, A & CA, 2105618, A & EP, 598998, A2 & US, 5830470, A & US, 5874255, A	1-33, 53-65, 67-68
Y	JP, 5-304989, A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 November, 1993 (19. 11. 93) & EP, 533199, A2 & AU, 9224581, A & CA, 2078539, A & US, 5750078, A & US, 5807548, A & US, 5866692, A	1-33, 53-65, 67-68
Y	BIRD R.E. et al., "Single-chain antigen-binding proteins", Science (1988) Vol. 242, No. 4877, p.423-426	1, 6, 34-43, 56-65, 67-68

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
17 August, 1999 (17. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02661

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WEBBER, K.O. et al., "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog", Mol. Immunol. (1995) Vol. 32, No. 4, p.249-258	1, 6, 34, 44-52, 56-65, 67-68
Y	MITOLA, S. et al., "Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor", Blood (1997) Vol. 90, No. 4, p.1365-1372	1-65, 67-68
Y	SHIBUYA, M. et al., "Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene(flt) closely related to the fms family", Oncogene (1990) Vol. 5, No. 4, p.519-524	1-65, 67-68
P, Y	WO, 98/22616, A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 28 May, 1998 (28. 05. 98) & AU, 9850666, A & EP, 882799, A1	1-65, 67-68

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/02661

### Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 66  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 66 pertains to diagnostic methods for the human body.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

### Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/02661

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl\* C07K 16/28, C12N 15/13, C12N 5/10, C12P 21/08, C07K 16/46, G01N 33/53, G01N 33/577, A61K 39/395

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl\* C07K 16/28, C12N 15/13, C12N 5/10, C12P 21/08, C07K 16/46, G01N 33/53, G01N 33/577, A61K 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),  
GenBank/EMBL/DDBJ, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 95/21868, A1 (IMCLONE SYSTEMS INC.) 17.8月. 1995 (17.08.95) & AU, 9519147, A & EP, 741748, A1 & US, 5840301, A & US, 5874542, A	1-65, 67-68
Y	JP, 6-205694, A1 (協和醸酵工業株式会社) 26.7月. 1994 (26.07.94) & AU, 9346181, A & CA, 2105618, A & EP, 598998, A2 & US, 5830470, A & US, 5874255, A	1-33, 53-65, 67-68
Y	JP, 5-304989, A1 (協和醸酵工業株式会社) 19.11月. 1993 (19.11.93) & EP, 533199, A2 & AU, 9224581, A & CA, 2078539, A & US, 5750078, A & US, 5807548, A & US, 5866692, A	1-33, 53-65, 67-68

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17.08.99	国際調査報告の発送日 31.08.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9281

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	BIRD, R. E. et al. "Single-chain antigen-binding proteins", Science(1988)Vol. 242, No. 4877, p. 423-426	1, 6, 34-43, 56-65, 67-68
Y	WEBBER, K. O. et al. "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog", Mol. Immunol. (1995) Vol. 32, No. 4, p. 249-258	1, 6, 34, 44-52 , 56-65, 67-68
Y	MITOLA, S. et al. "Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor", Blood(1997) Vol. 90, No. 4, p. 1365-1372	1-65, 67-68
Y	SHIBUYA, M. et al. "Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene(flt) closely related to the fms family", Oncogene(1990) Vol. 5, No. 4, p. 519-524	1-65, 67-68
P, Y	WO, 98/22616, A1 (協和醣酵工業株式会社) 28.5月. 1998(28.05.98) & AU, 9850666, A & EP, 882799, A1	1-65, 67-68

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 6 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 6 6 は、人の身体の診断方法に関するものである。

2.  請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。